



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 249 154 A3

4(51) C 12 Q 1/28

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 Q / 274 984 7

(22) 09.04.85

(45) 02.09.87

(71) Forschungsinstitut für Medizinische Diagnostik, 8080 Dresden, Karl-Marx-Straße 3, DD

(72) Pfützner, Ludwig, Dr. rer. nat.; Kretzschmar, Frank, Dr. rer. nat.; Rost, Inge, Dipl.-Chem.; Thiele, Hans-Jürgen, Prof. Dr. rer. nat. Dr. sc. med.; Knabe, Günter, Dipl.-Chem.; Plaschnick, Dieter, Dipl.-Chem., DD

(54) Testmittel zur Bestimmung von Substanzen in Körperflüssigkeiten

(57) Die Erfindung betrifft die Verbesserung der Lagerstabilität von Testmitteln zur Bestimmung von Substanzen in Körperflüssigkeiten. Die Erfindung hat das Ziel, zur Vermeidung ökonomischer Verluste die Lagerfähigkeit von Testmitteln zu verbessern, ohne dabei gleichzeitig die Indikatorreaktion wesentlich zu beeinträchtigen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Testmittel mit verringerter Autoxydation herzustellen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst, indem den Testmitteln ein oder mehrere Sulfite oder ein Gemisch aus Hydroxylamin und einem oder mehreren Sulfiten zugesetzt wird, denn es wurde überraschend gefunden, daß durch diese Zusätze die Autoxydation ohne wesentliche Beeinträchtigung der Indikatorreaktion unterdrückt werden kann. Unter Ausnutzung des erfindungsgemäßen Effektes können Testmittel mit verbesserter Lagerfähigkeit hergestellt werden. Diese Testmittel können beispielsweise in der medizinischen Diagnostik und in der Therapiekontrolle zur Bestimmung von Substanzen in Körperflüssigkeiten eingesetzt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Testmittel zur Bestimmung von Substanzen in Körperflüssigkeiten auf der Basis des Oxydase/ Peroxydase-Systems und unter Verwendung von aromatischen Diaminen bzw. Benzidinen als Farbentwickler und einem Farbkuppler bzw. Farbfixiermittel bei pH-Werten von ≥ 5 , **dadurch gekennzeichnet**, daß in den Testmitteln ein oder mehrere Alkali- bzw. Ammoniumsulfite oder ein Gemisch aus Hydroxylamin und einen oder mehreren Alkali- bzw. Ammoniumsulfiten enthalten sind.
2. Testmittel nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das oder die Alkali- bzw. Ammoniumsulfite in einer Gesamtkonzentration von 2 bis 1000 Mol-% Sulfite, vorzugsweise 50 bis 200 Mol-% Sulfite, bezogen auf den Farbentwickler, enthalten sind.
3. Testmittel nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Hydroxylamin in einer Konzentration von 0 bis 1000 Mol-%, vorzugsweise 50 bis 200 Mol-%, bezogen auf den Farbentwickler, enthalten ist.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verbesserung der Lagerstabilität von Testmitteln, in denen autoxydable Indikatorsysteme verwendet werden, zur Bestimmung von Substanzen in Körperflüssigkeiten. Sie sollen bevorzugt in der medizinischen Diagnostik und in der Therapiekontrolle eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bei den bisher bekannten Testmitteln, die zur Bestimmung von Substanzen in Körperflüssigkeiten eine Oxydase/Peroxydase-Reaktion verwenden (z. B. Testmittel zum Nachweis von Glucose, Harnsäure, Aminosäuren, Triglyzeriden, Cholesterin, Pyruvat u. a.), werden häufig zum Nachweis des intermediär entstehenden Wasserstoffperoxyds substituierte Benzidine (DE-OS 2460903) oder substituierte p-Phenylendiamine in Verbindung mit einem Farbkuppler eingesetzt.

Nachteilig an derartigen Indikatorsystemen ist ihre hohe Empfindlichkeit gegen Licht, Luftsauerstoff und Feuchtigkeit. Besonders die substituierten p-Phenylendiamine werden vor allem bei höheren pH-Werten, die beispielsweise für eine schnelle Farbkupplung bzw. für bestimmte enzymatische Reaktionen angewendet werden, in steigendem Maße angegriffen. Deshalb läuft bereits während der Lagerung der Testmittel die Indikatorreaktion ohne Einwirkung des Probengutes teilweise ab, wodurch diese Testmittel nur eine begrenzte Zeit verwendbar sind.

Es ist aus der Photochemie bekannt, daß Lösungen von substituierten Phenylendiaminen durch Zusatz von beispielsweise Hydroxylamin und Natriumsulfite gegen den Angriff durch Luftsauerstoff stabilisiert werden können (DRP 743262; Meyer, K., Brune, W.: Z. wiss. Photographie 46 [1951], 169). Dabei muß allerdings eine z. T. beträchtliche Störung der Farbreaktion während des Entwicklungsvorganges in Kauf genommen werden.

Es ist weiterhin bekannt, daß Wasserstoffperoxid sowohl Hydroxylamin als auch Alkalisulfite sehr schnell oxydiert (Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie, Verlag Chemie, Berlin 1936, 23, 572; Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1960, 9, 514f.), was den Einsatz dieser Substanzen zur Stabilisierung eines Systems mit dessen Hilfe Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden soll, als unmöglich erscheinen läßt.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, zur Vermeidung ökonomischer Verluste die Lagerfähigkeit von Testmitteln, in denen autoxydable Indikatorsysteme verwendet werden, zu verbessern, ohne dabei gleichzeitig die Indikatorreaktion wesentlich zu beeinträchtigen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Testmittel mit verringerter Autoxydation und damit verbesserter Lagerstabilität herzustellen.

Die Testmittel können entweder auf der Basis von mit den Reagenzien imprägnierten Matrizen oder auf der Basis von Filmen, die die Reagenzien enthalten, beruhen. Sie werden vor der Verwendung in handliche und damit materialsparende Formate (z. B. Teststreifen) geschnitten.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß den Testmitteln auf der Basis der Oxydase/Peroxydase-Reaktion und mit autoxydablen Indikatorsystemen ein oder mehrere Sulfite oder ein Gemisch aus Hydroxylamin und einem oder mehreren Sulfite zugesetzt werden, denn es wurde überraschend gefunden, daß durch diese Zusätze die Autoxydation ohne wesentliche Beeinträchtigung der Indikatorreaktion unterdrückt werden kann (s. Tabelle 1, Testmittel Nr. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 sowie Zusammenstellung in Beispiel 3), wodurch sich die Lagerfähigkeit der Testmittel ohne Empfindlichkeitsverlust wesentlich verbessert (s. Tabelle 1). Diese Nichtbeeinträchtigung der Indikatorreaktion durch die erfindungsgemäßen, stabilisierenden Zusätze ist aus zwei Gründen besonders wichtig. Einerseits kann in diesem Falle der im Verlauf der Lagerung auftretende Abbau der stabilisierenden Zusätze nicht zu einem Anstieg der Empfindlichkeit, d. h. zu falsch positiven Werten führen. Andererseits kann bei einer ungestörten Indikatorreaktion die Wasseraufnahme von Testmitteln auf Filmbasis minimal gehalten werden, was sich bekanntlich bei Verwendung von Vollblut als Untersuchungsmaterial vorteilhaft auf die Hämatokritabhängigkeit der Testergebnisse auswirkt.

Tabelle 1: Einfluß der Mengen an stabilisierenden Zusätzen auf die Autoxydation und die Farbausbeute verschiedener Testmittel (außer der Menge an eingesetzter Oxydase und der Antioxydankonzentration gleiche Rezepturen und Eigenschaften bei Nr. 1 bis 5 bzw. Nr. 6 bis 10)

Testmittel zum Glucosenachweis, pH 7,2...7,4

Nr.	Na ₂ O ₃ /Hydroxylamin (jeweils in Mol-% bezogen auf substituiertes p-Phenylendiamin)	relativer Leerwertanstieg innerhalb eines Jahres bei kühler und trockener Lagerung (in %, bezogen auf unstabilisierten Film)	Farbausbeute (in %, bezogen auf unstabilisierten Film, Verwendung von Vollblut, 30 mmol/l Glucose)
1	0	100	100
2	10	73	97
3	50	42	98
4	100	38	89
5	200	31	69

Testmittel zum Harnsäurenachweis, pH 8,0...8,2

Nr.	Na ₂ SO ₃ (in Mol-% bezogen auf substituiertes p-Phenylendiamin)	relativer Leerwertanstieg innerhalb eines Jahres bei kühler und trockener Lagerung (in %, bezogen auf unstabilisierten Film)	Farbausbeute (in %, bezogen auf unstabilisierten Film, Verwendung von Vollblut, 500 µmol/l Harnsäure)
6	0	100	100
7	10	75	98
8	50	47	98
9	100	40	92
10	200	34	75

Die Eignung dieser Zusätze zur Vermeidung von Autoxydation war nicht vorauszu sehen, da neben der Autoxydationsschutzwirkung auch die hohe Reaktivität dieser Verbindungen gegenüber Wasserstoffperoxyd, welches in den Testmitteln mit Oxydase/Peroxydase-Reaktion intermediär entsteht und quantitativ nachgewiesen werden soll, allgemein bekannt ist (Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie, Verlag Chemie, Berlin 1936, 23, 572; Gmelin's Handbuch der anorganischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1960, 3, 514f.). Zweckmäßigerweise werden die Zusätze im stöchiometrischen Verhältnis zum Entwickler eingesetzt, ohne daß die erzielte Wirkung auf diese Konzentration beschränkt ist. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusätze können Testmittel mit verbesserter Lagerstabilität hergestellt werden.

Ausführungsbeispiele

Im folgenden soll anhand von Ausführungsbeispielen die Erfindung näher erläutert werden.

Beispiel 1:

Testfilme zum Glucosenachweis

Es werden 5 Testfilme mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

Gelatine	6 g
1-[3'-Sulfo-4'-phenoxyphenyl]-3-[carboxyheptadecyl-amidopyrrolon-(5)]	368 mg
4-(N,N-δ-Sulfobutyl-butylammonium)-anilinium-sulfat	360 mg
Glucoseoxydase	15 000 U
Peroxydase	1 500 U

sowie neben den üblichen Hilfsstoffen wie Netzmittel, Weichmacher und Härter je Begußlösung folgende Mengen an stabilisierenden Zusätzen:

Film-Nr.	Hydroxylamin-[mg] sulfat	Na ₂ SO ₃ · 7 H ₂ O [mg]
1	0	0
2	7,5	23
3	37	116
4	74	232
5	148	464

Die Mischungen werden auf pH 7,3...7,4 eingestellt und auf transparente Zelluloseacetatfolien, welche mit einer Haftschrift versehen sind, aufgetragen und getrocknet. Anschließend werden die Testfilme zweckmäßigerweise in Streifen geschnitten. Die Testfilme haben hinsichtlich ihrer Lagerstabilität sowie Farbausbeute die in Tab. 1 zusammengestellten Eigenschaften.

Beispiel 2:

Testfilme zum Harnsäurenachweis

Es werden 5 Testfilme mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

Gelatine	25 g
1-[3'-Sulfo-4'-phenoxyphenyl]-3-[carboxyheptadecyl-amidopyrrolon-(5)]	230 mg
4-(N,N-δ-Sulfobutyl-butylammonium)-anilinium-sulfat	150 mg
Uricase	75 U
Peroxydase	5 000 U
Na-Boratpuffer (SÖRENSEN-CLARK)	75 ml

Sowie neben den üblichen Hilfsstoffen wie Netzmittel, Weichmacher und Härter je Begußlösung folgende Mengen an Natriumsulfat:

Film-Nr.	Na ₂ SO ₃ · 7 H ₂ O [mg]
6	0
7	10
8	48
9	96
10	192

Die Mischungen werden auf pH 8,0...8,2 eingestellt und auf transparente Zelluloseacetatfolien, welche mit einer Haftschrift versehen sind, aufgetragen und getrocknet. Anschließend werden die Testfilme zweckmäßigerweise in Streifen geschnitten. Die Testfilme haben hinsichtlich ihrer Lagerstabilität sowie Farbausbeute die in Tab. 1 zusammengestellten Eigenschaften. Die obigen Beispiele stellen keine Einschränkung der erfindungsgemäßen Lösung dar. Sie sollen deren Allgemeingültigkeit für verschiedene enzymatische Reaktionen und Reaktionen bei verschiedenen pH-Werten demonstrieren.

Beispiel 3:

Testmittel zum Glucosenachweis:

Es werden 5 Testfilme mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

Gelatine	6 g
1-[3'Sulfo-4'-phenoxyphenyl]-3-[carboxyheptadecylamidopyrrolon-(5)]	368 mg
4-(N,N-δ-Sulfobutyl-butylammonium)-amilinium-sulfat	360 mg
Glucoseoxydase	15 000 U
Peroxydase	1 500 U

sowie neben den üblichen Hilfsstoffen wie Netzmittel, Weichmacher und Härter je Begußlösung folgende Mengen an stabilisierenden Zusätzen:

Film-Nr.	Hydroxylamin-sulfat [mg]	(NH ₄) ₂ SO ₃ [mg]	K ₂ SO ₃ · 2 H ₂ O [mg]
11	0	0	0
12	0	10,5	0
13	0	53	0
14	0	107	0
15	0	214	0
16	0	0	18
17	0	0	89
18	0	0	179
19	0	0	357
20	7,5	10,5	0
21	37	53	0
22	74	107	0
23	148	214	0

Die Mischungen werden auf pH 7,3...7,4 eingestellt und auf transparente Zelluloseacetatfolien, welche mit einer Haftschrift versehen sind, aufgetragen und getrocknet. Anschließend werden die Testmittel zweckmäßigerweise in Streifen geschnitten.

Die Testmittel haben hinsichtlich ihrer Lagerstabilität sowie Farbausbeute die in der folgenden Zusammenstellung ausgewiesenen Eigenschaften.

Zusammenstellung der Eigenschaften der Testmittel

Film-Nr.	relativer Leerwertanstieg innerhalb eines Jahres bei kühler und trockener Lagerung (in %, bezogen auf den unstabilierten Film)	Farbausbeute (in %, bezogen auf den unstabili- erten Film, Verwendung von Vollblut, 30 mmol/l Glucose)
11	100	100
12	76	99
13	47	93
14	41	90
15	37	71
16	80	97
17	46	95
18	42	89
19	33	66
20	71	98
21	39	93
22	36	88
23	25	62