(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 925 T2** 2007.10.31

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 678 580 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 925.9**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 309 842.6**
(96) Europäischer Anmeldetag: **28.12.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.10.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.02.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.10.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/26*** (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

33866193	**28.12.1993**	**JP**
26419794	**27.10.1994**	**JP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:
Unitika Ltd., Amagasaki, Hyogo, JP; Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Abitz & Partner, 81677 München

(72) Erfinder:
Senba,Shoji c/o Unitika Ltd., Uji-shi Kyoto, JP; Kurosaka,Keisuke c/o Unitika Ltd., Kyoto, JP; Kondo,Hitoshi c/o Unitika Ltd., Kyoto, JP; Kojima,Masami c/o cen Res Lab, Iatron Lab,Inc., Katori-gun Chiba-ken, JP; Suzuki,Hiroshi c/o Yachiyo Plant, Yachiyo-shi Chiba-ken, JP

(54) Bezeichnung: **Reagens zur Messung von direktem Bilirubin**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Reagenzien zur Messung von in biologischen Flüssigkeiten vorliegendem direktem Bilirubin.

STAND DER TECHNIK

[0002] Bilirubin ist ein gelbes Pigment, das zu den Tetrapyrrolen gehört. Es ist ein Abbauprodukt von Häm und liegt bekanntlich in großen Mengen in der Galle vor. Das Bilirubin in biologischen Flüssigkeiten besteht hauptsächlich aus direktem und indirektem Bilirubin.

[0003] Als Folge von hämolytischer Anämie und Gelbsucht nimmt die Menge an indirektem Bilirubin deutlich zu, während bei obstruktiver Gelbsucht die Menge an direktem Bilirubin zunimmt. Aus diesem Grund ist die separate Bestimmung von direktem und indirektem Bilirubin für die klinische Diagnose von Bedeutung. Üblicherweise wurden in klinischen Laboratorien Gesamt- und direktes Bilirubin gemessen. Es bedarf jedoch einer genaueren Methode zur Bestimmung der Menge an direktem Bilirubin.

[0004] Verschiedene Verfahren stehen zur Bestimmung der Menge an direktem Bilirubin zur Verfügung, einschließlich derjenigen Verfahren, bei denen Diazo-Reagenzien eingesetzt werden, Verfahren, bei denen Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt wird, Verfahren, bei denen Oxidasen, wie z.B. Bilirubin-Oxidase, eingesetzt werden, und Verfahren, bei denen Oxidationsmittel, wie z.B. Vanadinsäureionen und Manganionen, eingesetzt werden.

[0005] Verschiedene Verfahren, bei denen Diazo-Reagenzien eingesetzt werden, welche unterschiedliche Diazotisierungsbeschleuniger verwenden, und verschiedene Verfahren zur Bestimmung des erzeugten Azobilirubins wurden bislang publiziert. Das von Malloy und Evelyn [Journal of Biological Chemistry, Band 119, S. 481 (1937)] publizierte Verfahren ist eines davon. Das US-Patent Nr. 4 892 833 offenbart ein Verfahren und ein Reagenzienkit zur Bestimmung von direktem und Gesamt-Bilirubin in Körperflüssigkeiten durch Kopplung des Bilirubins mit einem Diazoniumsalz und Bestimmung der dadurch herbeigeführten Extinktionsänderung.

[0006] Verfahren, bei denen HPLC zur Bestimmung der Menge an Bilirubin eingesetzt wird, sind u.a. zum Beispiel ein Verfahren, das Phosphatpuffer und Isopropanol als Elutionsmittel für die Umkehrphasen-HPLC-Säule verwendet, welche von Lauft et al. [Journal of Chromatography, Band 226, S. 391 (1981)] publiziert wurde.

[0007] Bei den Verfahren, bei denen Oxidasen eingesetzt werden, wird Bilirubin durch die Oxidasen oxidiert, was zum Verschwinden seiner gelben Farbe bei einer Wellenlänge von etwa 450 nm führt. Anschließend wird die Extinktionsänderung der Bilirubinlösung vor und nach der Reaktion gemessen, um die Menge an Bilirubin zu erhalten. Es ist möglich, durch Abändern der Reaktionsbedingungen spezifisch direktes Bilirubin zu oxidieren. Bei solchen Verfahren verwendete Reagenzien sind u.a. zum Beispiel Reagenzien, die Bilirubin-Oxidase enthalten [Clinical Chemistry, Band 20, S. 783 (1974)], und Reagenzien, die Lactase, Tyrosinase, Ascorbatoxidase und andere Oxidasen enthalten (Japanisches Patent 62-33880). Weitere Reagenzien zur Messung von direktem Bilirubin mit Bilirubin-Oxidasen, die durch geeignete Auswahl des pH-Werts, der Puffer und Tenside so optimiert wurden, dass sie nur mit direktem Bilirubin reagieren, wurden vorgeschlagen.

[0008] Diese Reagenzien zur Messung von direktem Bilirubin sind u.a. zum Beispiel Reagenzien, die Bilirubin-Oxidase enthalten, die in Puffern von pH 9 bis 11 umgesetzt werden (Japanisches Patent 5-68240), Reagenzien, die Bilirubin-Oxidasen in Säurepuffern mit einem pH-Wert von 5 bis 6 mit anionischen Tensiden enthalten (Japanisches Patent 5-9066), Reagenzien, die Bilirubin-Oxidasen in Puffern mit einem pH-Wert von 3,5 bis 4,5 enthalten (Japanisches Patent 61-44000), Reagenzien, die Bilirubin-Oxidasen in Puffern mit einem pH-Wert von 2,0 bis 3,3 mit Kaliumferrocyanid und/oder Kaliumferricyanid enthalten (Japanische Patentanmeldung 1-5499).

[0009] Bei den Verfahren, bei denen Oxidationsmittel eingesetzt werden, wird Bilirubin durch Oxidationsmittel oxidiert, was zum Verschwinden seiner gelben Farbe bei einer Wellenlänge von etwa 450 nm führt, und die Extinktionsänderung der Bilirubinlösung wird vor und nach der Reaktion gemessen, um die Menge an Bilirubin zu bestimmen. Es ist auch möglich, durch Abändern der Reaktionsbedingungen spezifisch direktes Bilirubin zu oxidieren. Die bei diesen Verfahren verwendeten Reagenzien sind u.a. zum Beispiel Reagenzien, die Vanadinsäureionen verwenden [Clinical Chemistry, Band 22, S. 116 (1993)]. Ferner wurden Reagenzien zur Mes-

sung von direktem Bilirubin vorgeschlagen, bei denen durch geeignete Auswahl von Inhibitoren, Puffer usw., um die Reaktion von indirektem Bilirubin zu inhibieren, die Oxidationsmittel nur mit direktem Bilirubin reagieren. Diese Reagenzien zur Messung von direktem Bilirubin sind u.a. zum Beispiel ein Reagenz zur Bestimmung der Menge an direktem Bilirubin durch Verwendung von Vanadinsäureionen oder Manganionen als Oxidationsmittel und von einer oder mehreren Verbindungen, ausgewählt aus Hydrazinen, Hydroxylaminen, Oximen, aliphatischen polyvalenten Aminen, Phenolen, wasserlöslichen Makromolekülen und nichtionischen Tensiden mit einem HLB-Wert von 15 oder höher als Reaktionsinhibitoren für indirektes Bilirubin (Japanische Patentanmeldung 5 18978).

[0010] Herkömmliche Verfahren zur differentiellen Bestimmung der Menge an direktem Bilirubin mittels HPLC, um direktes Bilirubin von anderen Bilirubin-Spezies ausreichend zu trennen, wurden berichtet, sie besitzen jedoch eine Reihe von Problemen, wie z.B. die Tatsache, dass dabei teure und spezielle Geräte eingesetzt werden, dass zur Analyse eine lange Zeit benötigt wird und dass nicht mehrere Proben gleichzeitig analysieren werden können.

[0011] Andererseits haben die Verfahren zur Bestimmung der Menge an direktem Bilirubin durch Reagierenlassen von Bilirubin-Oxidasen oder anderen Oxidasen Vorteile, wie z.B. die Möglichkeit der Verwendung optischer Messungen, die Einfachheit des Verfahrens und dessen relativ hohe Genauigkeit. Sie können jedoch die Bilirubine nicht ausreichend trennen, da die Reaktion mit direktem Bilirubin nicht perfekt ist, oder sie reagieren nicht nur mit direktem, sondern auch mit etwas indirektem Bilirubin. Zusätzlich müssen diese Reaktionen außerhalb des optimalen pH-Bereichs für Bilirubin-Oxidasen durchgeführt werden. Aus den obigen Gründen muss eine große Menge an Enzymen verwendet werden, und die Reagenzien werden teuer. Um solche Probleme zu lösen, verbesserten die Erfinder der vorliegenden Erfindung die Spezifität für direktes Bilirubin durch Zugabe von Fluoriden und/oder Reduktionsmitteln und schlugen Reagenzien zur Messung von direktem Bilirubin vor, die im optimalen pH-Bereich von BOD verwendet werden können (Japanische Patentanmeldung 5-276992). Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Fähigkeit dieses Reagenzes, direktes und indirektes Bilirubin zu trennen, nicht perfekt ist.

[0012] Reagenzien, bei denen Vanadinsäureionen oder Manganionen als Oxidationsmittel eingesetzt werden, werden nicht nur mit direktem, sondern auch mit etwas indirektem Bilirubin reagieren, was zu einer unzureichenden partiellen Bestimmung führt, selbst wenn Inhibitoren für indirektes Bilirubin zum Einsatz kommen, wie z.B. Hydrazine, Hydroxylamine, Oxime usw.

[0013] Die Verfahren, bei denen Diazoreagenzien eingesetzt werden, sind für die Trennung von direktem und indirektem Bilirubin gedacht, wobei diazotierende Reaktionsbeschleuniger zugegeben werden oder nicht. Das Problem bei der Verwendung dieser Art von Reagenz ist dessen unvollkommene Trennung der zwei Bilirubine, genau wie bei den Reagenzien mit Oxidasen und Oxidationsmitteln. Die Unvollkommenheit ist besonders ausgeprägt, wenn Proben mit niedrigem Albumingehalt und Proben mit Salicylsäuren und anderen Medikamenten gemessen werden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung untersuchten Wege zur Lösung der Probleme der herkömmlichen Reagenzien zur Messung von direktem Bilirubin, wobei die oben genannten Umstände in Betracht gezogen wurden. Als Folge davon wurde die vorliegende Erfindung durch Entdeckung der Tatsache abgeschlossen, dass direktes Bilirubin mit hoher Genauigkeit ohne Reaktion von indirektem Bilirubin gemessen werden kann, wenn man Tetrapyrrolverbindungen in den Reagenzien existieren lässt. Solche Reagenzien können Reagenzien sein, die direktes Bilirubin messen, welche spezifisch direktes Bilirubin durch Bilirubin-Oxidasen, Oxidationsmittel oxidieren oder durch Umwandlung von direktem Bilirubin in Azobilirubin durch Reaktion von Diazoniumsalzen.

[0015] Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Reagenz zur Messung von direktem Bilirubin zur Verfügung, das die optische Messung der Extinktionsänderung von direktem Bilirubin, welche von der Reaktion von Bilirubin-Oxidasen herrührt, ermöglicht, wobei Tetrapyrrolverbindungen zu dem Reagenz mit Bilirubin-Oxidase zugegeben werden.

[0016] Ferner stellt die vorliegende Erfindung ein Reagenz zur Messung von direktem Bilirubin zur Verfügung, das die optische Messung der Extinktionsänderung von direktem Bilirubin, welche von dessen Reaktion mit einem Oxidationsmittel herrührt, ermöglicht, wobei Tetrapyrrolverbindungen zu dem Reagenz mit Oxidationsmitteln zugegeben werden.

[0017] Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein Reagenz zur Messung von direktem Bilirubin zur Verfügung, das die optische Messung der Extinktionsänderung in direktem Bilirubin, welche von dessen Reaktion mit Diazoniumsalzen herrührt, ermöglicht, wobei Tetrapyrrolverbindungen zu dem Reagenz mit Diazoniumsalzen zugegeben werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] Fig. 1 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die indirektes Bilirubin enthalten. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, das Bilirubin und Enzyme (Bilirubin-Oxidase), hergeleitet von Trachyderma (bei Beispiel 1) oder Myrothecium (bei Beispiel 2), enthält.

[0019] Für die Vergleichsbeispiele 1 und 2 wurden die gleichen Proben unter Verwendung von Reagenzien ohne Bilirubin gemessen, und diese sind ebenfalls in der Figur gezeigt.

[0020] Fig. 2 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die indirektes Bilirubin enthalten. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, welches Bilirubin und Enzyme (Bilirubin-Oxidase), hergeleitet von Myrothecium, enthält. Vergleichsbeispiele, bei denen die verwendeten Reagenzien keine Tetrapyrrolverbindung enthalten, sind ebenfalls in der Figur gezeigt.

[0021] Fig. 3 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die direktes Bilirubin enthalten. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, welches Bilirubin und Enzyme (Bilirubin-Oxidase), hergeleitet von Trachyderma, enthält.

[0022] Fig. 4 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die direktes Bilirubin enthalten. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, welches Bilirubin und Enzyme (Bilirubin-Oxidase), hergeleitet von Myrothecium, enthält.

[0023] Fig. 5 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die direktes Bilirubin enthalten. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, welches Bilirubin und Enzyme (Bilirubin-Oxidase), hergeleitet von Myrothecium, enthält.

[0024] Fig. 6 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die direktes Bilirubin enthalten. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, welches Bilirubin und Enzyme (Bilirubin-Oxidase), hergeleitet von Myrothecium, enthält.

[0025] Fig. 7 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die direktes Bilirubin enthalten, für die Beispiele 21 bis 24. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, welches Natriummetavanadat (als Oxidationsmittel) enthält.

[0026] Fig. 8 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die direktes Bilirubin enthalten, für die Beispiele 25 bis 28. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung mit Sulfansäure (als eine Diazoverbindung).

[0027] Fig. 9 zeigt die Beziehung zwischen dem gemessenen Wert für die Menge an direktem Bilirubin und dem Verdünnungsverhältnis von Proben, die direktes Bilirubin enthalten, für die Beispiele 29 bis 32. Das verwendete Reagenz ist das der vorliegenden Erfindung, welches Sulfansäure (als eine Diazoverbindung) enthält.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0028] Das Reagenz zur Messung von direktem Bilirubin gemäß der vorliegenden Erfindung kann ein aus zwei Teilen bestehendes Reagenziensystem sein, das ein erstes Reagenz mit einer Pufferlösung und (einer) Tetrapyrrolverbindung(en) und ein zweites Reagenz mit Bilirubin-Oxidasen, Oxidationsmitteln oder Diazoniumsalzen enthält, oder ein Ein-Reagenz-System sein, bei dem alle Komponenten in einer Lösung enthalten sind.

[0029] Die zu den Reagenzien zugegebenen Tetrapyrrolverbindungen unterliegen bei der vorliegenden Erfindung keinen besonderen Einschränkungen. Zum Beispiel können Bilirubin, Biliverdin und Urobilinogen unabhängig oder in Kombination verwendet werden. Ebenso können andere Tetrapyrrolverbindungen verwendet werden. Die Verwendung von Bilirubin ist besonders bevorzugt. Die Konzentration kann im Bereich von 0,01 bis 100 µg/ml liegen, vorzugsweise bei 0,1 bis 40 µg/ml. Wenn die Konzentration der Tetrapyrrolverbindungen unter der Untergrenze des obigen Bereichs liegt, wird indirektes Bilirubin teilweise mit direktem Bilirubin oxidiert, was nicht erwünscht ist.

[0030] Die in dem Reagenz der vorliegenden Erfindung verwendeten Bilirubin-Oxidasen können zum Beispiel Enzyme sein, die von Myrothecium oder Trachyderma hergeleitet sind. Die benötigte Menge beträgt 0,001 bis 200 Einheiten/ml, besonders bevorzugt 0,005 bis 20 Einheiten/ml.

[0031] Der zu verwendende Puffer sollte eine Pufferkapazität von pH 6,5 oder weniger besitzen, vorzugsweise zwischen pH 3,0 bis 6,5, was für die zu verwendenden Enzyme vom Standpunkt ihrer Stabilität und Aktivität aus bevorzugt ist. Beispiele sind u.a.

[0032] Phthalsäure-Natriumhydroxid-Puffer, Äpfelsäure-Natriumhydroxid-Puffer, Citronensäure-Natriumcitrat-Puffer usw. Die Konzentration des Puffers kann 20 bis 500 mM betragen, vorzugsweise 30 bis 300 mM.

[0033] Andere Komponenten können angemessen zugegeben werden, wie z.B. p-Toluolsulfonsäure, Benzoesäure und andere aromatische Carbonsäuren, Tenside, Alanine, Serine und andere Aminosäure, Mannit und andere Zucker, Polyethylenglycol und andere Polyole, NaCl und andere Salze, Albumin und andere Proteine usw.

[0034] Die Art der Vanadinsäureionen, die als Oxidationsmittel in dem Messreagenz der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, unterliegt keinen besonderen Einschränkungen. Bevorzugte Beispiele sind u.a. diejenigen, die VO_3^-, VO_4^{3-} oder andere 5-valente Vanadiumverbindungen enthalten. Obwohl Vanadinsäuren alleine verwendet werden können, ist es vom Standpunkt der Löslichkeit aus bevorzugt, Vanadinsäuren in Form von Lithium-, Natrium-, Kalium- und anderen Alkalimetall- oder Ammoniumsalzen zu verwenden.

[0035] Manganionen können als Oxidationsmittel in dem Messreagenz der vorliegenden Erfindung verwendet werden und können nicht nur gewöhnliche Mangansalze, wie z.B. Mangan(III)acetat, sein, sondern auch Verbindungen, die mit Acetylaceton, Ethylendiamintetraessigsäure oder anderen Chelatbildnern Chelate bilden.

[0036] Die Konzentration der Vanadinsäureionen und Manganionen unter liegt keinen besonderen Einschränkungen, vorausgesetzt, dass sie ausreicht, eine Oxidation von in der Probe enthaltenem Bilirubin zu ermöglichen. Sie sollte im Allgemeinen im Bereich von 0,1 bis 50 µg Ionen/ml, vorzugsweise von 0,5 bis 10 µg Ionen/ml, liegen.

[0037] Hydrazine, Hydroxylamine, Oxime, aliphatische polyvalente Amine, Phenole, wasserlösliche Makromoleküle, nichtionische Tenside mit einem HLB-Wert von 15 oder höher können als Inhibitoren für indirektes Bilirubin in dem Reagenz der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Art dieser Inhibitoren unterliegt keinen besonderen Einschränkungen, vorausgesetzt, dass die Oxidation von direktem Bilirubin nicht beeinflusst wird. Bevorzugte Beispiele für jeden Typ sind wie folgt: Hydrazinspezies sind u.a. zum Beispiel Hydrazine, Phenylhydrazine und deren Mineralsäuresalze (Salzsäuresalze, Sulfate usw.). Hydroxylaminspezies sind u.a. zum Beispiel Hydroxylamine, Phenylhydroxylamine und deren Mineralsäuresalze (Salzsäuresalze, Sulfate usw.). Oximspezies sind u.a. zum Beispiel Acetoxim, Diacetylmonooxim, Salicylaldoxim usw. Aliphatische polyvalente Aminspezies sind u.a. zum Beispiel Tetraethylenpentamin, Hexamethylentetramin, Triethylentetramin usw. Phenolspezies sind u.a. zum Beispiel Phenol, p-Chlorphenol, p-Acetamidphenol, 4-Chlor-1-naphthol, β-Naphthol usw. Wasserlösliche Makromoleküle sind u.a. zum Beispiel Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon usw. Nichtionische Tenside mit einem HLB-Wert von 15 oder höher sind u.a. zum Beispiel Emulgen-123p (Polyoxyethylenlaurylether von Kao), Emulgen-950 (Polyoxyethylennonylphenylether von Kao), Emulgen-985 (Polyoxyethylennonylphenylether von Kao), Triton X-405 (Polyoxyethylenisooctylphenylether von Rohm und Haas Co.) usw. Diese Inhibitoren inhibieren wirksam unabhängig die Oxidation von indirektem Bilirubin. Die Wirkung kann verstärkt werden, wenn eine Kombination aus zwei oder mehreren Inhibitoren verwendet wird. Diese Inhibitoren werden für jede Anwendung geeignet ausgewählt. Die Konzentration dieser Inhibitoren unterliegt keinen besonderen Einschränkungen, vorausgesetzt, dass die Oxidation von indirektem Bilirubin in der Probe inhibiert wird, und kann vom gewählten Inhibitortyp abhängen, im Allgemeinen liegt sie jedoch im Bereich von 0,01 bis 10% (Gew./Vol.).

[0038] Bei dem Reagenz der vorliegenden Erfindung nimmt der Reagenz-Leerwert ab, was zu einer Verbesserung der Analysengenauigkeit führt, wenn Chelatbildner verwendet werden. Auch wird das Reagenz stabilisiert, und die Oxidation von Bilirubin wird durch die Zugabe von Chelatbildnern beschleunigt. Bevorzugte Chelatbildner, die für den obigen Zweck verwendet werden können, sind u.a. zum Beispiel Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Nitrirotriessigsäure (NTA), Cyclohexandiamintetraessigsäure (CyDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), Hydroxyethylethylendiamintriessigsäure (EDTA-OH), Triethylentetraiminhexaessigsäure (TTHA), Hydroxyethylimindiessigsäure (HIDA), 1-Hydroxyethan-1, 1-Diphosphorsäure oder deren Alkalimetallsalze (zum Beispiel Lithiumsalze, Natriumsalze, Kaliumsalze usw.) und Ammoniumsalze usw. Die Konzentration dieser Chelatbildner unterliegt keinen besonderen Einschränkungen, vorausgesetzt, dass die Messung von Bilirubin nicht beeinflusst wird, und kann im Bereich von 0,02 bis 65 mM, vorzugsweise 1 bis 40 mM, besonders bevorzugt zwischen 1 und 25 mM, liegen.

[0039] Diazoreagenzien, die in dem Reagenz der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, können beliebige bekannte Diazoreagenzien sein, die bei herkömmlichen Verfahren verwendet werden, wie zum Beispiel nichtstabilisierte Diazoreagenzien, die in der Japanischen Patentanmeldung 56-12555 offenbart sind (diazotierte Derivate von Sulfanilsäure, o-Dianisidin, p-Chloranilin, 1,5-Dichloranilin, 2,4-Dichloranilin, 2-Methoxy-4-nitroanilin, 1-Aminoanthrachinon, 2-Nitroanilin und 4-Chlormethylanilin), und stabilisierte Diazoreagenzien (Borattetrafluorid, 1,5-Naphthalindisulfonsäuresalze und Zinkchloridsalze der oben genannten nichtstabilisierten Diazoreagenzien). Insbesondere 2,4-Dichlorphenyldiazonium-1,5-naphthalindisulfonsäure und deren Salze (zum Beispiel Natriumsalze, Kaliumsalze usw.), p-Sulfanylbenzoldiazonium-1,5-naphthalinsulfonsäure und deren Salze, p-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoridborsäure und deren Salze, Diazosulfanylsäuretetrafluoridborsäure und deren Salze und andere stabilisierte Diazoniumsalze ermöglichen die einfache Messung und sind somit wirksame Diazoreagenzien, die in dem Reagenz der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0040] Andere Reagenzien, wie z.B. Puffer und Antiseptika, können passend ausgewählt werden aus Puffern, die bei bekannten chemischen Oxidationsverfahren, Bilirubin-Oxidase-Verfahren usw. verwendet werden (zum Beispiel Phosphat, Citrat, Succinat, Acetat, Phthalat usw.), und aus Antiseptika, wie z.B. Paraben, und in dem Reagenz der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Ihre Konzentration und der pH-Wert der Messreagenzien können ebenfalls passend gemäß den angegebenen Reagenzien in den bekannten Verfahren ausgewählt werden.

[0041] Das Reagenz der vorliegenden Erfindung kann auch durch geeignete Auswahl der oben genannten Bestandteile und Vermischen dieser gemäß bekannten Verfahren hergestellt werden. Ein bevorzugtes Beispiel umfasst ein erstes Reagenz, das 10 bis 200 mM Phthalatpuffer, eingestellt auf pH 4,7 bis 6,5, 0,005 bis 0,5% Polyethylenglycolmono-p-isooctylphenylether, 5 bis 100 mM Alanin, 1 bis 100 mM p-Toluolsulfonsäure, 0,001 bis 1% menschliches Serumalbumin, 0,05 bis 200 mM Natriumfluorid, 0,02 bis 10 mM N-Acetylcystein und 0,1 bis 10 µg/ml Bilirubin enthält, und ein zweites Reagenz, das 0,001 bis 100 Einheiten/ml Bilirubin-Oxidase und 10 bis 200 mM Phthalatpuffer, eingestellt auf pH 4,7 bis 6,5, enthält. Es ist möglich, Reagenzien herzustellen, die eine genauere Messung der Konzentration von direktem Bilirubin ermöglichen, indem 1 bis 10 µg/l Bilirubin zu einem ersten Reagenz aus im Handel erhältlichen diagnostischen Reagenzien zur Messung von direktem Bilirubin, wie z.B. NESCAUTO D-BIL-VE (Nippon Shoji Kaisha Ltd.), Ekdia DB (EIKEN Chemical) oder D-BIL-Reagenz C (International Reagents Corp.) usw., zugegeben werden.

[0042] Direktes Bilirubin kann durch das nachstehend im Detail beschriebene Verfahren der vorliegenden Erfindung mittels der Reagenzien der vorliegenden Erfindung gemessen werden.

[0043] Zunächst wird zum Beispiel zu einer Lösung, die einen Puffer und Bilirubin oder andere Tetrapyrrolverbindungen enthält, eine passende Menge verschiedener Spezies, die Bilirubin enthalten (Blutplasma, Serum, Urin oder andere biologische Flüssigkeiten), zugegeben. Anschließend wird die Lösung in der Zelle eines Spektrophotometers vorerwärmt und die Extinktion der Lösung bei einer bestimmten Wellenlänge (460 nm oder in diesem Bereich) gemessen (Extinktion 1). Ein zweites Reagenz, das Bilirubin-Oxidase enthält, wird zu der Lösung zugegeben, und man lässt die Reaktion 1 bis 10 Minuten ablaufen, damit das direkte Bilirubin oxidiert wird. Die Extinktion wird erneut bei etwa 460 nm gemessen (Extinktion 2). Die Änderung der Extinktion (A) bei der oben genannten Wellenlänge wird durch Multiplizieren eines Verdünnungsfaktors des Reagenzes mit der Extinktion 1 und 2 ermittelt. Anschließend wird eine Vergleichssubstanz, die direktes Bilirubin in einer bekannten Konzentration enthält, durch das gleiche Verfahren gemessen, um die Extinktionsänderung (B) zu erhalten und um eine Eichkurve zu erhalten. Die Änderung der Extinktion (A) wird über die Eichkurve gelegt, um die Menge an in der Probe vorhandenem direktem Bilirubin zu bestimmen. Anhand der Änderung der Extinktion (A) und (B) wird der Gehalt an direktem Bilirubin der Probe mittels der folgenden Gleichung berechnet.

Konzentration von direktem Bilirubin in Probe (mg/dl) = A/B × Konzentration an direktem Bilirubin in Eichlösung (mg/dl)

[0044] Das Volumen der Probe kann vorzugsweise 0,005 bis 0,1 ml betragen. Die Wellenlänge, bei der die Messung durchgeführt wird, ist nicht auf 460 nm beschränkt, sondern kann eine beliebige Wellenlänge im Bereich von 400 bis 480 nm sein. Das Volumen des ersten und das des zweiten Reagenzes und das der Probe können entsprechend variieren.

[0045] Die Reaktion kann unter normalen Bedingungen durchgeführt werden. Zum Beispiel kann die Reaktionstemperatur im Bereich von 25 bis 45°C liegen, vorzugsweise bei 35 bis 40°C, und die Reaktionszeit kann im Bereich von 1 bis 30 Minuten, vorzugsweise 3 bis 15 Minuten, liegen.

[0046] Wenn die Menge an direktem Bilirubin mittels eines Oxidationsmittels gemessen wird, wird eine Probe, die Bilirubin enthält, zu einem ersten Reagenz, das einen Pufferinhibitor und, falls erforderlich, Chelatbildner enthält, zugegeben, um eine Lösung zu erzeugen. Die Extinktion der Lösung wird bei einer bestimmten Wellenlänge (zwischen 430 und 460 nm) gemessen (Extinktion 1). Anschließend wird ein zweites Reagenz, das Vanadinsäureionen oder Manganionen und, falls erforderlich, Chelatbildner enthält, zu der obigen Lösung zugegeben. Die Oxidation von Bilirubin findet 3 bis 15 Minuten lang bei 25 bis 40°C statt. Anschließend wird die Extinktion bei der bestimmten Wellenlänge erneut gemessen (Extinktion 2). Die Änderung der Extinktion (A) bei der oben genannten bestimmten Wellenlänge wird durch Multiplikation eines Verdünnungsfaktors des Reagenzes mit der Extinktion 1 und 2 ermittelt. Anschließend wird die Änderung der Extinktion (A) über eine Eichkurve gelegt, die aus der Änderung der Extinktion (B) für die Reaktion einer Vergleichssubstanz erhalten wurde, um die Menge an direktem Bilirubin in der Probe zu ermitteln. Alternativ wird die obige Gleichung verwendet, um die Menge an direktem Bilirubin in der Probe zu berechnen.

[0047] Das gleiche Verfahren kann angewandt werden, wenn ein Diazoniumsalz verwendet wird. Ein Puffer wird als das erste Reagenz verwendet, eine Probe, die Bilirubin enthält, wird zu dem Puffer zugegeben, um eine Lösung herzustellen, und die Extinktion der Lösung wird bei einer bestimmten Wellenlänge (zwischen 540 und 600 nm) (Extinktion 1) gemessen. Anschließend wird das zweite Reagenz, das Diazoniumsalze enthält, zu der obigen Lösung zugegeben und bei 25 bis 40°C 3 bis 15 Minuten lang umgesetzt. Die Extinktion bei der bestimmten Wellenlänge wird erneut gemessen (Extinktion 2). Die Änderung der Extinktion (A) wird aus der Extinktion (1) und (2) ermittelt, und die Menge an direktem Bilirubin in der Probe wird aus der Änderung der Extinktion (B) gemessen, welche wie oben gemessen wird. Ein alternatives Verfahren zur Messung der Konzentration von direktem Bilirubin unter Verwendung eines Diazoniumsalzes ist nachstehend beschrieben.

[0048] Das erste Reagenz, das Diazoniumsalze enthält, wird mit einer Probe, die Bilirubin enthält, vermischt. Die Mischung reagiert bei 25 bis 40°C 3 bis 15 Minuten lang. Ein Puffer wird zu der Lösung zugegeben. Die weitere Reaktion findet bei 25 bis 40°C 3 bis 15 Minuten lang statt. Die Extinktion dieser Lösung wird bei einer bestimmten Wellenlänge (zwischen 540 und 660 nm) gemessen. Anschließend wird die Extinktion über die Eichkurve gelegt, die aus der Extinktion erhalten wurde, welche aus der Reaktion einer Vergleichssubstanz stammte, um die Menge an direktem Bilirubin in der Probe zu messen.

[0049] Andere Messverfahren stehen ebenfalls zur Verfügung. Zum Beispiel wird bei dem obigen Verfahren, bei dem ein Oxidationsmittel eingesetzt wird, die Extinktion der Lösung, die eine Mischung aus dem ersten Reagenz und der Probe enthält, als Extinktion 1 genommen, und die Extinktion der Lösung, welche eine vorvermischte Mischung aus dem ersten und dem zweiten Reagenz enthält, die man mit der Probe reagieren lässt, wird als Extinktion 2 genommen. Durch Verwendung dieser zwei gemessenen Werte wird die Konzentration von direktem Bilirubin in der Probe durch Nacharbeiten der obigen Verfahren bestimmt.

[0050] Wie oben beschrieben, reagieren die Reagenzien der vorliegenden Erfindung nicht mit indirektem Bilirubin, das in Bilirubin enthaltenden Proben enthalten ist, da die Reagenzien der vorliegenden Erfindung Tetrapyrrolverbindungen zusammen mit Bilirubin-Oxidasen, Vanadinsäuren oder Manganionen oder Diazoreagenz enthalten. Es ist daher möglich, die Menge an direktem Bilirubin alleine mit hoher Genauigkeit zu messen.

Beispiele

[0051] Die vorliegende Erfindung wird weiter durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, die jedoch nicht als die Erfindung oder deren Details einschränkend aufgefasst werden sollen. Bei den Beispielen wurde die Extinktion mittels eines automatischen Hitachi-7070-Analysegeräts gemessen.

<Probenherstellung>

Probe 1: Bilirubin (von Sigma) wurde in 100 mM Tris-Salzsäurepuffer (pH 8,0) gelöst. 0, 0,2, 0,6, 0,8 und 1,0 mg/dl Bilirubin-Lösungen, die Rinderserumalbumin enthielten, wurden zugegeben, um eine Probe mit indirektem Bilirubin zu ergeben. In anderen Worten, die Konzentrationen von direktem Bilirubin in diesen Proben betrugen 0 mg/dl. Die Konzentration der verwendeten Rinderserumalbuminlösungen (von Boehringer Mannheim Japan) betrug 3,2 g/dl. Der pH-Wert von Tris-Salzsäurepuffer betrug 8,5.
Probe 2: Durch Verwendung der Rinderserumalbuminlösung von Probe 1 und "Ortho Liquid Normal Control Serum" (von Ortho Diagnostics Corp., hier nachfolgend als "Ortho Normal" bezeichnet) wurde eine Probe mit Ortho Normal (ohne Bilirubin) hergestellt.
Probe 3: 0,5 mg/dl Bilirubin wurden zur Ortho Normal zugegeben.
Probe 4: 1,0 mg/dl Bilirubin wurden zu Ortho Normal zugegeben.
Probe 5: Eine Probe mit direktem Bilirubin wurde durch Verdünnen einer Lösung von High Level Check BIL (von Takara Shuzo Co., Ltd.) mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

<Herstellung der Reagenzien>

Reagenz 1: Reagenz 1 wurde durch Zugabe von 60 mM Kaliumhydrogenphthalat (pH 5,0), 0,01 % Polyethylenglycolmono-p-isooctylphenylether, 0,002% menschlichem Serumalbumin, 40 mM p-Toluolsulfonsäure, 2,0 mM N-Acetylcystein, 2,0 mM Natriumfluorid, 40 mM Alanin und 0,5 µg/ml Bilirubin hergestellt.
Reagenz 2: Reagenz 2 wurde durch Zugabe von 5,0 Einheiten/ml Bilirubin-Oxidase, hergeleitet von Trachyderma (von Takara Shuzo Co., Ltd), zu Reagenz 1 hergestellt.
Reagenz 3: Reagenz 3 wurde durch Zugabe von 5 µg/ml Bilirubin zu dem ersten Reagenz eines im Handel erhältlichen Diagnosereagenzkits, einem Reagenz zur Messung von direktem Bilirubin, bekannt als NESCAUTO D-BIL-VE (von Nippon Shoji Kaisha Ltd.), hergestellt.
Reagenz 4: Das zweite Reagenz von NESCAUTO D-BIL-VE (von Nippon Shoji Kaisha Ltd.) wurde als Reagenz 4 verwendet.
Reagenz 5: Reagenz 5 wurde durch Zugabe von 5 µg/ml Bilirubin zu dem ersten Reagenz von Ekdia DB (von EIKEN Chemical) hergestellt.
Reagenz 6: Das zweite Reagenz von Ekdia DB (von EIKEN Chemical) wurde als Reagenz 6 verwendet.
Reagenz 7: Reagenz 7 wurde durch Zugabe von 5 µg/ml Bilirubin zu dem ersten Reagenz von D-BIL Reagent C (von International Reagents Corp.) hergestellt.
Reagenz 8: Das zweite Reagenz von D-BIL Reagent C (International Reagents Corp.). Die Reagenzien 4, 6 und 8 enthalten Bilirubin-Oxidasen, die von Myrothecium hergeleitet sind (von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.).
Reagenz 9: Reagenz 1 ohne Bilirubin.
Reagenz 10: Reagenz 3 ohne Bilirubin.
Reagenz 11: Reagenz 5 ohne Bilirubin.
Reagenz 12: Reagenz 7 ohne Bilirubin.
Reagenz 13: 20 mM Salzsäurehydroxylamin und 10 mM Hydroxyethandisulfonsäure wurden zu 100 mM Weinsäurepuffer mit pH 2,9 zugegeben.
Reagenz 14: 0,4 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 13 zugegeben.
Reagenz 15: 4 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 13 zugegeben.
Reagenz 16: 20 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 13 zugegeben.
Reagenz 17: 40 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 13 zugegeben.
Reagenz 18: 8 mM Hydroxyethandisulfonsäure und 4 mM Natriummetavanadat wurden zu einem Phosphatpuffer mit pH 7,0 zugegeben.
Reagenz 19: 65 mM Salzsäure mit pH 1,0.
Reagenz 20: 0,4 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 19 zugegeben.
Reagenz 21: 4 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 19 zugegeben.
Reagenz 22: 20 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 19 zugegeben.
Reagenz 23: 40 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 19 zugegeben.
Reagenz 24: Ein Reagenz, das 8,1 mM Sulfanilsäure und 1,4 mM Natriumnitrit enthielt, wurde hergestellt.
Reagenz 25: Ein Reagenz, das 5,1 mM Sulfanilsäure und 0,5 mM Natriumnitrit enthielt, (blaue Farbe unter den alkalischen Bedingungen) wurde hergestellt.
Reagenz 26: 0,4 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 25 zugegeben.
Reagenz 27: 4 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 25 zugegeben.
Reagenz 28: 20 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 25 zugegeben.
Reagenz 29: 40 µg/ml Bilirubin wurden zu Reagenz 25 zugegeben.
Reagenz 30: 22 mM Weinsäurepuffer, eingestellt auf pH 13,5.

<Beispiel 1>

[0052] Probe 1 (0,014 ml) wurde zu dem obigen Reagenz 1 (0,28 ml) zugegeben. Die Mischung wurde 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Probenleerwerte wurden bezüglich des Endvolumens korrigiert, indem die Extinktion der Lösung bei 450 nm gemessen wurde. Reagenz 2 (0,07 ml) wurde zugegeben, und man ließ die Lösung bei 37°C 5 Minuten reagieren. Die Extinktion der Lösung bei 450 nm wurde gemessen, und die Menge an direktem Bilirubin in der Probe wurde mittels Ditaurobilirubin mit bekannter Konzentration als Vergleichslösung ermittelt. Das Ergebnis ist in Fig. 1 gezeigt.

<Vergleichsbeispiel 1>

[0053] Die gleiche Messung wie in Beispiel 1 wurde durchgeführt, wobei Reagenz 9 anstelle von Reagenz 1 verwendet wurde.

[0054] Die Ergebnisse der obigen Beispiele sind in Fig. 1 gezeigt.

<Beispiel 2, Vergleichsbeispiel 2>

[0055] Eine Probe wurde mittels des gleichen Verfahrens wie in Beispiel 1 hergestellt, wobei die Reagenzien 3 und 4 anstelle der Reagenzien 1 und 2 verwendet wurden (Beispiel 2).

[0056] Eine Probe wurde mittels des gleichen Verfahrens wie in Vergleichsbeispiel 1 hergestellt, wobei Reagenz 10 anstelle von Reagenz 9 verwendet wurde (Vergleichsbeispiel 2).

[0057] Die Menge an direktem Bilirubin in den Proben wurde durch Messung ihrer Extinktion bei 450 nm ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt.

<Beispiele 3 und 4, Vergleichsbeispiele 3 und 4>

[0058] Eine Probe wurde mittels des gleichen Verfahrens wie in Beispiel 1 hergestellt, wobei die Reagenzien 5 und 6 (bei Beispiel 3) und die Reagenzien 7 und 8 (bei Beispiel 4) anstelle der Reagenzien 1 und 2 verwendet wurden.

[0059] Eine Probe wurde mittels des gleichen Verfahrens wie in Vergleichsbeispiel 1 hergestellt, wobei Reagenz 11 (für Vergleichsbeispiel 3) und Reagenz 12 (für Vergleichsbeispiel 4) anstelle von Reagenz 9 verwendet wurden.

[0060] Die Menge an direktem Bilirubin in den für die Beispiele 3, 4 und die Vergleichsbeispiele 3, 4 hergestellten Proben wurde durch Messung der Extinktion einer jeden Lösung bei 450 nm ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt.

[0061] Diese Ergebnisse zeigen, dass indirektes Bilirubin von dem Reagenz der vorliegenden Erfindung nicht oxidiert wird.

<Beispiele 5, 6, 7 und 8>

[0062] Eine Probe wurde mittels des gleichen Verfahrens wie in Beispiel 1, 2, 3 und 4 hergestellt, außer dass Probe 1 (die indirektes Bilirubin enthält) durch Probe 5 (die direktes Bilirubin enthält) ersetzt wurde.

[0063] Die Menge an direktem Bilirubin in den hergestellten Proben wurde durch Messung der Extinktion einer jeden Lösung bei 450 nm ermittelt. Die Beziehung zwischen den gemessenen Werten für jede Probe und der Konzentration von Probe 5 ist in den Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 bzw. Fig. 6 gezeigt.

<Beispiel 9>

[0064] Die Probe 2, 3 oder 4 wurde zu Reagenz 14 (0,28 ml) zugegeben. Die Mischung wurde 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Extinktion der Mischung wurde bei 450 nm (Subwellenlänge 546 nm) gemessen, wobei der Probenleerwert bezüglich des Endvolumens der Flüssigkeit korrigiert wurde. Durch Verwendung eines Ditaurobilirubins als Vergleichslösung wurde die Menge an direktem Bilirubin ermittelt. Anschließend wurde Reagenz 18 (0,07 ml) zugegeben. Die Mischung wurde 5 Minuten auf 37°C erwärmt und die Extinktion der Mi-

schung bei 450 nm (Subwellenlänge 546 nm) gemessen, wobei der Probenleerwert bezüglich des Endvolumens der Flüssigkeit korrigiert wurde.

<Beispiele 10, 11 und 12>

[0065] Eine Probe wurde wie in Beispiel 9 beschrieben hergestellt, wobei Reagenz 15 (bei Beispiel 10), Reagenz 16 (bei Beispiel 11) und Reagenz 17 (bei Beispiel 12) anstelle von Reagenz 14 verwendet wurden. Das gleiche Verfahren wie in Beispiel 9 wurde für diese Proben verwendet.

<Vergleichsbeispiel 5>

[0066] Die Probe 2, 3 oder 4 wurde zu Reagenz 13 (0,28 ml) zugegeben. Die Mischung wurde mittels der gleichen Verfahren wie in Beispiel 9 behandelt.

[0067] Die ermittelten Mengen an direktem Bilirubin für die Beispiele 9 bis 12 und Vergleichsbeispiel 5 sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Ergebnisse zeigen, dass das indirekte Bilirubin durch das Reagenz der vorliegenden Erfindung nicht oxidiert wird.

[Tabelle 1]

	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Vergleichsbeispiel 5	0,36	0,53	0,70
Arbeitsbeispiel 9	0,38	0,43	0,48
Arbeitsbeispiel 10	0,34	0,35	0,37
Arbeitsbeispiel 11	0,13	0,18	0,15
Arbeitsbeispiel 12	0,06	0,03	0,04

(mg/dl)

<Beispiel 13>

[0068] Die Probe 2, 3 oder 4 wurde zu 0,3 ml Reagenz 20 zugegeben und 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Extinktion der Probe bei 546 nm (Subwellenlänge 660 nm) wurde bezüglich des Endvolumens der Probe korrigiert. Anschließend wurde Reagenz 24 (0,15 ml) zu der Mischung zugegeben. Man ließ die Mischung 5 Minuten bei 37°C reagieren, und die Extinktion wurde bei 546 nm (Subwellenlänge 660 nm) gemessen. Anschließend wurde die Menge an direktem Bilirubin aus der gemessenen Extinktion einer jeden Probe bei 546 nm (Subwellenlänge 660 nm) unter Verwendung einer Ditaurobilirubinlösung bekannter Konzentration als Vergleichslösung erhalten.

<Beispiele 14, 15 und 16>

[0069] Das obige Verfahren von Beispiel 13 wurde durchgeführt, wobei die Reagenzien 21 (bei Beispiel 14), 22 (bei Beispiel 15) und 23 (bei Beispiel 16) anstelle von Reagenz 20 verwendet wurden.

<Vergleichsbeispiel 6>

[0070] Die Probe 2, 3 oder 4 wurde zu 0,3 ml Reagenz 19 zugegeben und 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Extinktion der Probe bei 546 nm (Subwellenlänge 660 nm) wurde bezüglich des Endvolumens der Probe korrigiert. Anschließend wurde die Menge an direktem Bilirubin aus der gemessenen Extinktion einer jeden Probe bei 546 nm (Subwellenlänge 660 nm) unter Verwendung einer Ditaurobilirubinlösung bekannter Konzentration als Vergleichslösung erhalten.

[0071] Die Ergebnisse der Beispiele 13 bis 16 und des Vergleichsbeispiels 6 sind in Tabelle 2 gezeigt.

[0072] Diese Ergebnisse zeigen, dass indirektes Bilirubin nicht von dem Reagenz der vorliegenden Erfindung oxidiert wird.

[Tabelle 2]

	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Vergleichsbeispiel 6	0,32	0,55	0,78
Arbeitsbeispiel 13	0,34	0,45	0,52
Arbeitsbeispiel 14	0,45	0,41	0,45
Arbeitsbeispiel 15	0,39	0,37	0,35
Arbeitsbeispiel 16	0,40	0,41	0,41

(mg/dl)

<Beispiel 17>

[0073] Die Probe 2, 3 oder 4 (jeweils 0,01 ml) wurde zu 0,15 ml Reagenz 26 zugegeben und 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden 0,3 ml Reagenz 30 zugegeben und weitere 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Menge an direktem Bilirubin wurde aus der gemessenen Extinktion einer jeden Probe bei 600 nm (Subwellenlänge 660 nm) unter Verwendung einer Ditaurobilirubinlösung bekannter Konzentration als Vergleichslösung erhalten.

<Beispiele 18, 19 und 20>

[0074] Das obige Verfahren von Beispiel 17 wurde durchgeführt, wobei die Reagenzien 27 (bei Beispiel 18), 28 (bei Beispiel 19) und 29 (bei Beispiel 20) anstelle von Reagenz 26 verwendet wurden.

<Vergleichsbeispiel 7>

[0075] Die Probe 2, 3 oder 4 (jeweils 0,01 ml) wurde zu 0,15 ml Reagenz 25 zugegeben und 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden 0,3 ml Reagenz 30 zugegeben und weitere 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Menge an direktem Bilirubin wurde aus der gemessenen Extinktion einer jeden Probe bei 600 nm (Subwellenlänge 660 nm) unter Verwendung einer Ditaurobilirubinlösung bekannter Konzentration als Vergleichslösung erhalten.

[0076] Die erhaltenen Ergebnisse der obigen Beispiele (17 bis 20) und des Vergleichsbeispiels 7 sind in Tabelle 3 gezeigt.

[0077] Diese Ergebnisse zeigen, dass das Reagenz der vorliegenden Erfindung indirektes Bilirubin nicht oxidiert.

[Tabelle 3]

	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Vergleichsbeispiel 7	0,35	0,51	0,71
Arbeitsbeispiel 17	0,27	0,38	0,49
Arbeitsbeispiel 18	0,39	0,43	0,43
Arbeitsbeispiel 19	0,31	0,32	0,35
Arbeitsbeispiel 20	0,14	0,19	0,19

(mg/dl)

<Beispiele 21 bis 32>

[0078] Die Messungen der Beispiele 9, 10, 11 und 12, der Beispiele 13, 14, 15 und 16 und der Beispiele 17, 18, 19 und 20 wurden unter Verwendung von Probe 5 anstelle von Probe 1 durchgeführt. Diese Messungen sind als Beispiele 21, 22, 23 und 24, Beispiele 25, 26, 27 und 28 und Beispiele 29, 30, 31 und 32 fortlaufend nummeriert.

[0079] Die Ergebnisse der Beispiele 21 bis 24 sind in Fig. 7 gezeigt.

[0080] Die Ergebnisse der Beispiele 25 bis 28 sind in Fig. 8 gezeigt.

[0081] Die Ergebnisse der Beispiele 29 bis 32 sind in Fig. 9 gezeigt.

[0082] Diese Figuren zeigen die Beziehung zwischen dem Verdünnungsverhältnis der Reagenzien und dem gemessenen Wert für die Konzentration von direktem Bilirubin in einer jeden Probe. Die Tatsache, dass die erhaltenen Ergebnisse eine gerade Linie bilden, die durch einen Punkt nahe des Ursprungs geht, zeigt, dass das Reagenz und das Verfahren der vorliegenden Erfindung genaue Ergebnisse beim Test auf direktes Bilirubin in einem Bereich, der für ihre Verwendung in tatsächlichen klinischen Tests ausreichend ist, ergeben.

[0083] Wie im Detail beschrieben, ermöglicht die vorliegende Erfindung die Messung von direktem Bilirubin, das bekanntermaßen in biologischen Flüssigkeiten von Patienten mit obstruktiver Gelbsucht deutlich ansteigt, getrennt von indirektem Bilirubin und eignet sich bei klinischen und anderen Untersuchungen, wo Genauigkeit erforderlich ist.

Patentansprüche

1. Ein Reagenz zur Messung von direktem Bilirubin in einer Probe, wobei das Reagenz eine oder mehrere Tetrapyrrolverbindung(en) und eine Einheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Bilirubin-Oxidase, einem Oxidationsmittel und einem Diazoniumsalz, enthält.

2. Ein Reagenz gemäß Anspruch 1, das auch einen Puffer enthält.

3. Ein Reagenz gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die eine oder die mehreren Tetrapyrrolverbindung(en) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, bestehend aus Bilirubin, Biliverdin, Urobilinogen und Kombinationen davon.

4. Ein Reagenz gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Tetrapyrrolverbindung in einer Konzentration von 0,1 bis 40 µg/ml vorliegt.

5. Ein Reagenz gemäß Anspruch 2, das eine erste Komponente, enthaltend einen Puffer und eine oder mehrere Tetrapyrrolverbindung(en), und eine zweite Komponente, enthaltend eine Einheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Bilirubin-Oxidase, einem Oxidationsmittel und einem Diazoniumsalz, enthält.

6. Ein Reagenz gemäß Anspruch 5, wobei die Tetrapyrrolverbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Bilirubin, Biliverdin, Urobilinogen und Kombinationen davon.

7. Ein Reagenz gemäß Anspruch 5 oder Anspruch 6, wobei die Tetrapyrrolverbindung in einer Konzentration von 0,1 bis 40 µg/ml vorliegt.

8. Ein Verfahren zur optischen Messung von direktem Bilirubin in einer Probe, das die Zugabe von einer oder mehreren Tetrapyrrolverbindung(en) und einer Einheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Bilirubin-Oxidase, einem Oxidationsmittel und einem Diazoniumsalz, zu einer Probe und die Messung der resultierenden Änderung der Extinktion umfasst.

9. Ein Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem die Tetrapyrrolverbindung Bilirubin ist.

10. Ein Verfahren gemäß Anspruch 8 oder Anspruch 9, umfassend die Schritte:
a. Kombinieren der Probe mit einem Puffer und einer Tetrapyrrolverbindung, um eine erste Lösung daraus zu bilden,
b. Erwärmen der ersten Lösung,
c. Messen der Extinktion der ersten Lösung bei einer vorgegebenen Wellenlänge,
d. Zugeben einer Einheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Bilirubin-Oxidase, einem Oxidationsmittel und einem Diazoniumsalz, zu der ersten Lösung, um eine zweite Lösung zu bilden,
e. Messen der Extinktion der zweiten Lösung bei einer vorgegebenen Wellenlänge und Ermitteln einer Änderung der Extinktion (A) zwischen der Extinktion der ersten und der zweiten Lösung,
f. Durchführen der Schritte a-e bei einer Standard-Probe, die direktes Bilirubin in einer bekannten Konzentration enthält, um eine Änderung der Extinktion (B) bei der Standard-Probe zu ermitteln, und
g. In-Beziehung-Setzen von A, B und der bekannten Konzentration von direktem Bilirubin in der Standard-Probe, um die Konzentration von direktem Bilirubin in der Probe zu ermitteln.

11. Ein Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, umfassend die Schritte:
a. Zugeben eines Reagenzes, das einen Puffer und eine oder mehrere Tetrapyrrolverbindung(en) enthält, zu einer Probe,
b. Äquilibrieren dieser Mischung bei einer gewählten Temperatur in einem Spektrophotometer,
c. Messen der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge zwischen 400 und 480 nm,
d. Zugeben eines Reagenzes, das eine Bilirubin-Oxidase enthält,
e. Ablaufenlassen der Reaktion 1 bis 30 Minuten lang bei 25 bis 45°C,
f. erneutes Messen der Extinktion, Berechnen der Änderung der Extinktion und Berichtigen dieser, um die Verdünnung zu berücksichtigen,
g. Berechnen des Gehalts der Probe an direktem Bilirubin durch Vergleich ihrer Änderung der Extinktion mit der von Standard-Proben.

12. Ein Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, umfassend die Schritte:
a. Zugeben eines Reagenzes, das einen Puffer und eine oder mehrere Tetrapyrrolverbindung(en) enthält, zu einer Probe,
b. Äquilibrieren dieser Mischung bei einer gewählten Temperatur in einem Spektrophotometer,
c. Messen der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge zwischen 430 und 460 nm,
d. Zugeben eines Reagenzes, das ein Mangan- oder Vanadium-Oxidationsmittel enthält,
e. Ablaufenlassen der Reaktion 3 bis 15 Minuten lang bei 25 bis 40°C,
f. erneutes Messen der Extinktion, Berechnen der Änderung der Extinktion und Berichtigen dieser, um die Verdünnung zu berücksichtigen,
g. Berechnen des Gehalts der Probe an direktem Bilirubin durch Vergleich ihrer Änderung der Extinktion mit der von Standard-Proben.

13. Ein Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, umfassend die Schritte:
a. Zugeben eines Reagenzes, das einen Puffer und eine oder mehrere Tetrapyrrolverbindung(en) enthält, zu einer Probe,
b. Äquilibrieren dieser Mischung bei einer gewählten Temperatur in einem Spektrophotometer,
c. Messen der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge zwischen 540 und 600 nm,
d. Zugeben eines Reagenzes, das ein Diazoniumsalz enthält,
e. Ablaufenlassen der Reaktion 3 bis 15 Minuten lang bei 25 bis 40°C,
f. erneutes Messen der Extinktion, Berechnen der Änderung der Extinktion und Berichtigen dieser, um die Verdünnung zu berücksichtigen,

g. Berechnen des Gehalts der Probe an direktem Bilirubin durch Vergleich ihrer Änderung der Extinktion mit der von Standard-Proben.

14. Verwendung eines Reagenzes, das eine oder mehrere Tetrapyrrolverbindung(en) und eine Einheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Bilirubin-Oxidase, einem Oxidationsmittel und einem Diazoniumsalz, enthält, zur Messung von direktem Bilirubin in einer Probe.

15. Verwendung gemäß Anspruch 14, wobei das Reagenz auch einen Puffer enthält.

16. Verwendung gemäß Anspruch 14 oder Anspruch 15, wobei die eine oder die mehreren Tetrapyrrolverbindung(en) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, bestehend aus Bilirubin, Biliverdin, Urobilinogen und Kombinationen davon.

17. Verwendung gemäß irgendeinem der Ansprüche 14 bis 16, wobei die Tetrapyrrolverbindung in einer Konzentration von 0,1 bis 40 µg/ml vorliegt.

18. Verwendung gemäß Anspruch 15, wobei das Reagenz eine erste Komponente, enthaltend einen Puffer und eine oder mehrere Tetrapyrrolverbindung(en), und eine zweite Komponente, enthaltend eine Einheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Bilirubin-Oxidase, einem Oxidationsmittel und einem Diazoniumsalz, enthält.

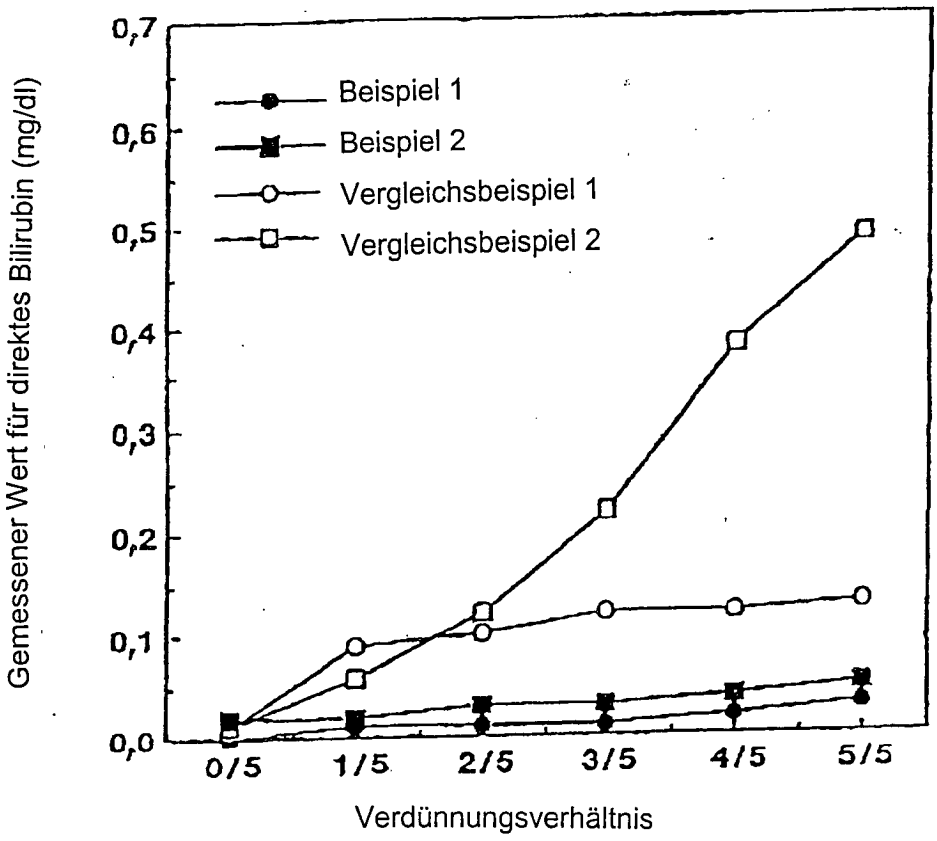
19. Verwendung gemäß Anspruch 18, wobei die Tetrapyrrolverbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Bilirubin, Biliverdin, Urobilinogen und Kombinationen davon.

20. Verwendung gemäß Anspruch 18 oder Anspruch 19, wobei die Tetrapyrrolverbindung in einer Konzentration von 0,1 bis 40 µg/ml vorliegt.

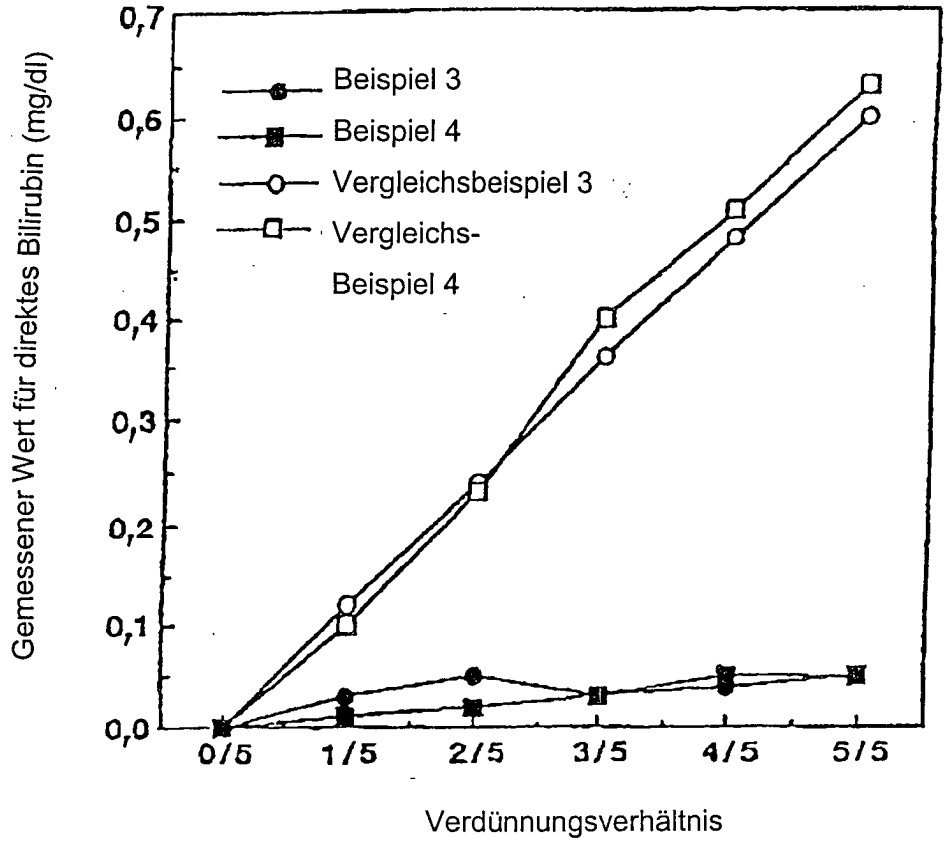
Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

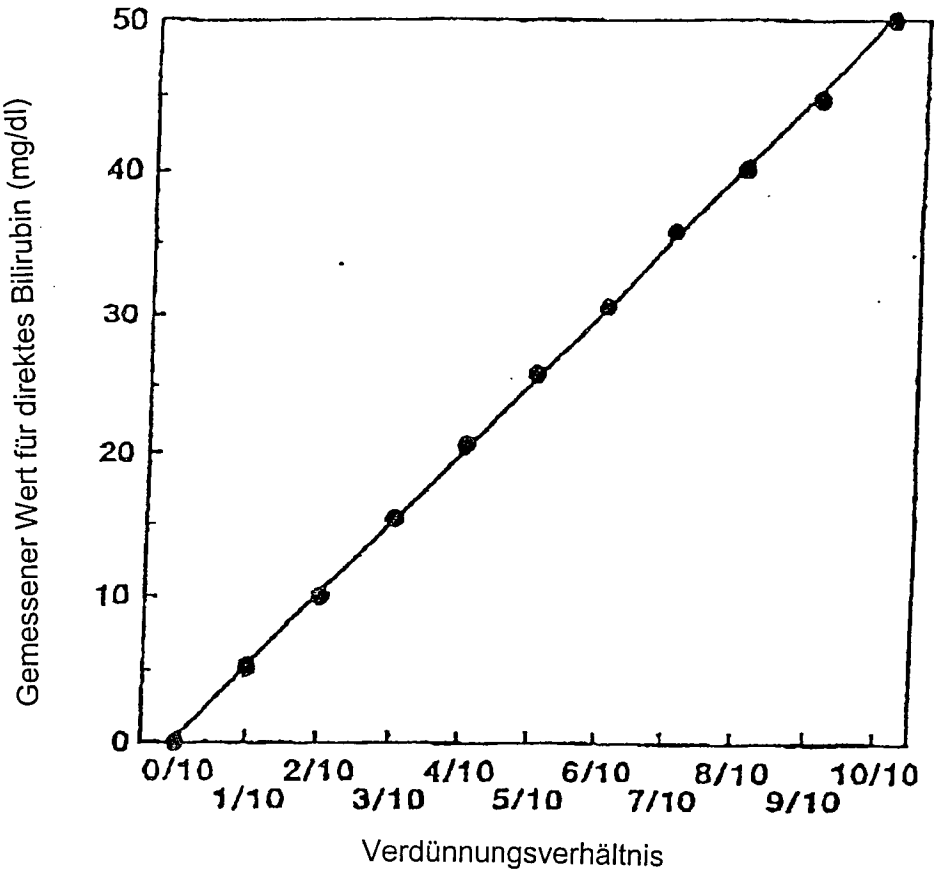
Figur 1



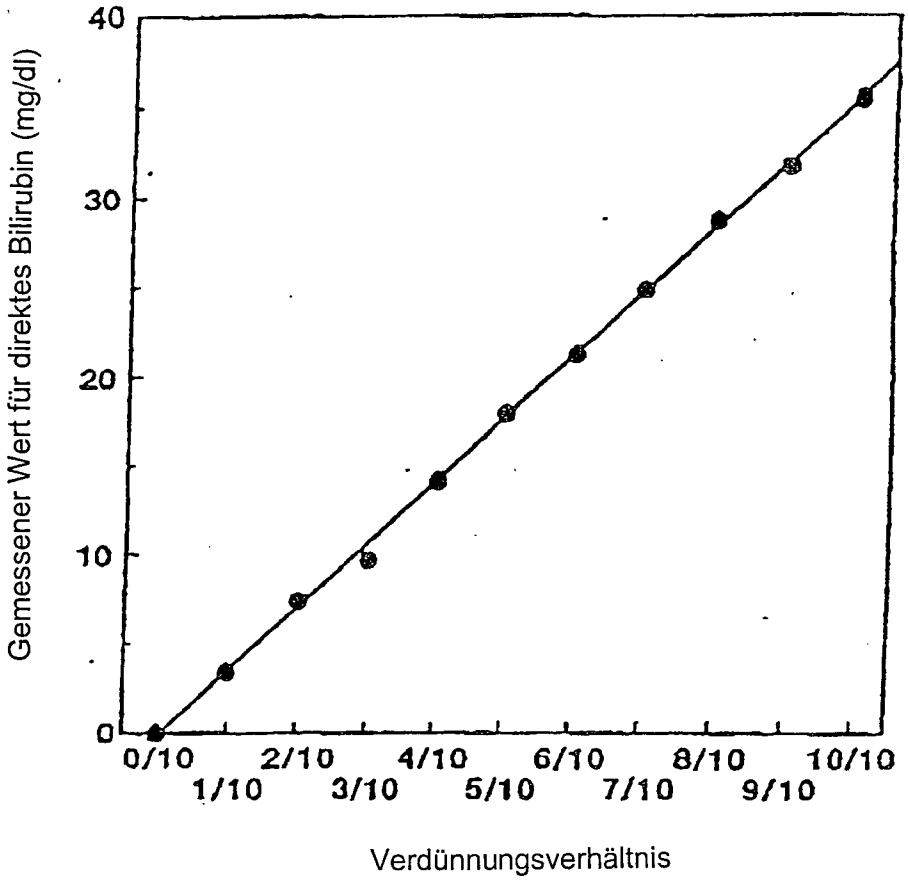
Figur 2


Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Beispiel 3
Beispiel 4
Vergleichsbeispiel 3
Vergleichs-
Beispiel 4
0/5
1/5
2/5
3/5
4/5
5/5
Verdünnungsverhältnis

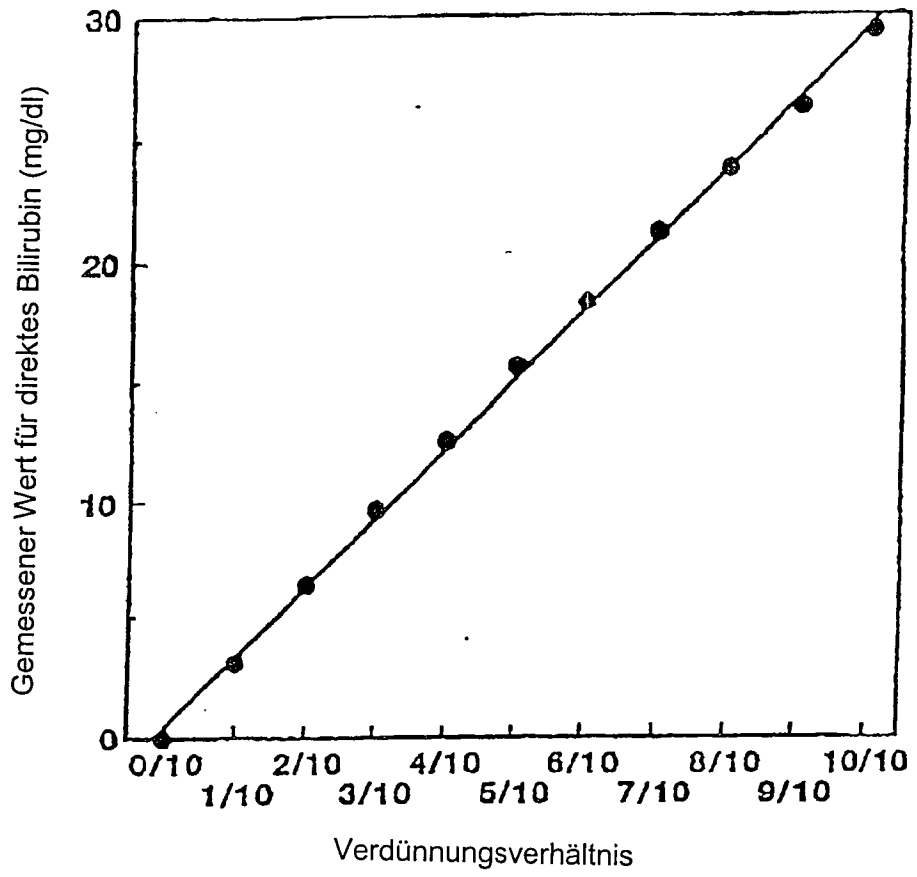
Figur 3


Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
50
40
30
20
10
0
0/10
1/10
2/10
3/10
4/10
5/10
6/10
7/10
8/10
9/10
10/10
Verdünnungsverhältnis

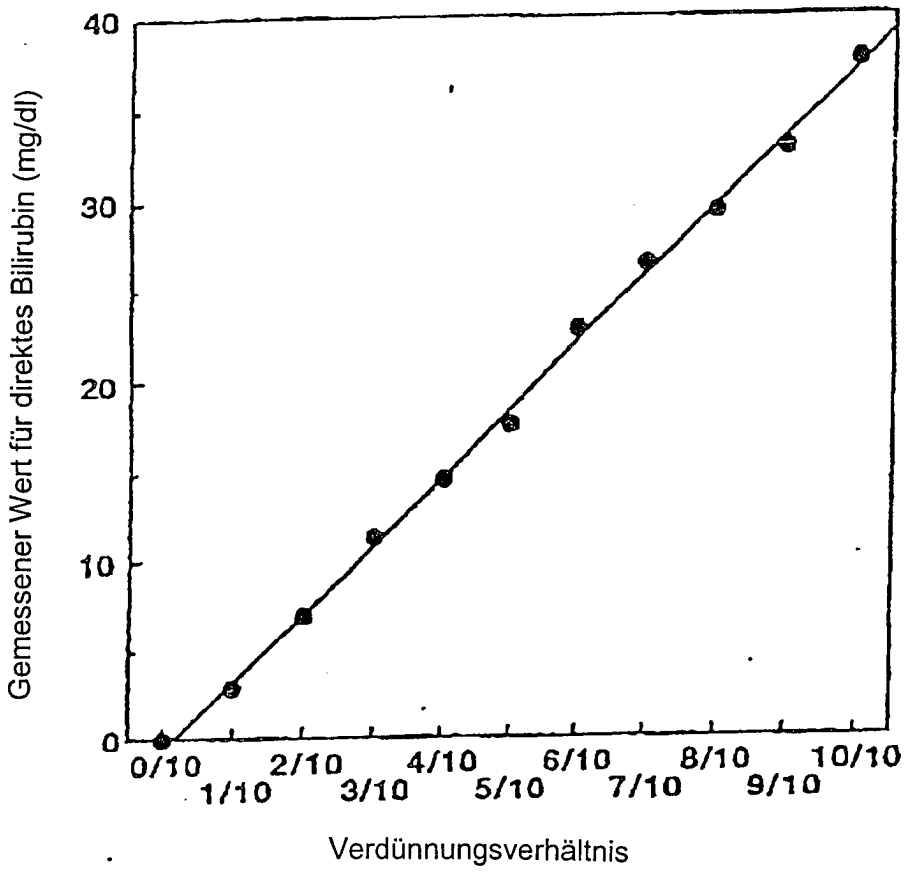
Figur 4


Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
40
30
20
10
0
0/10
1/10
2/10
3/10
4/10
5/10
6/10
7/10
8/10
9/10
10/10
Verdünnungsverhältnis

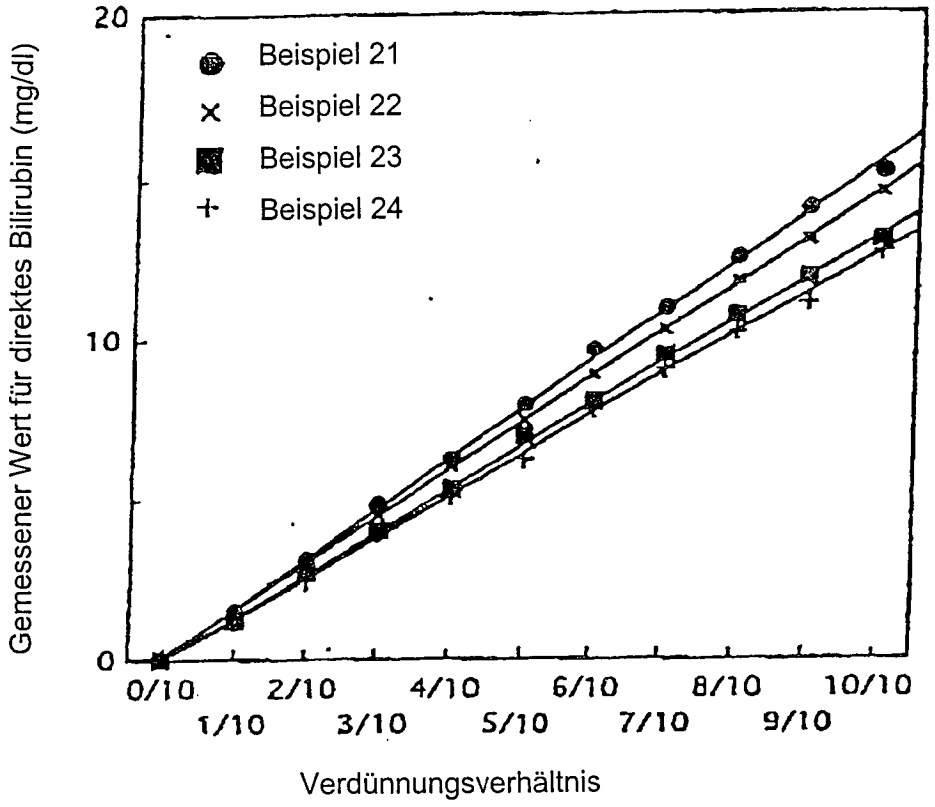
Figur 5


30
20
10
0
Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
0/10
1/10
2/10
3/10
4/10
5/10
6/10
7/10
8/10
9/10
10/10
Verdünnungsverhältnis

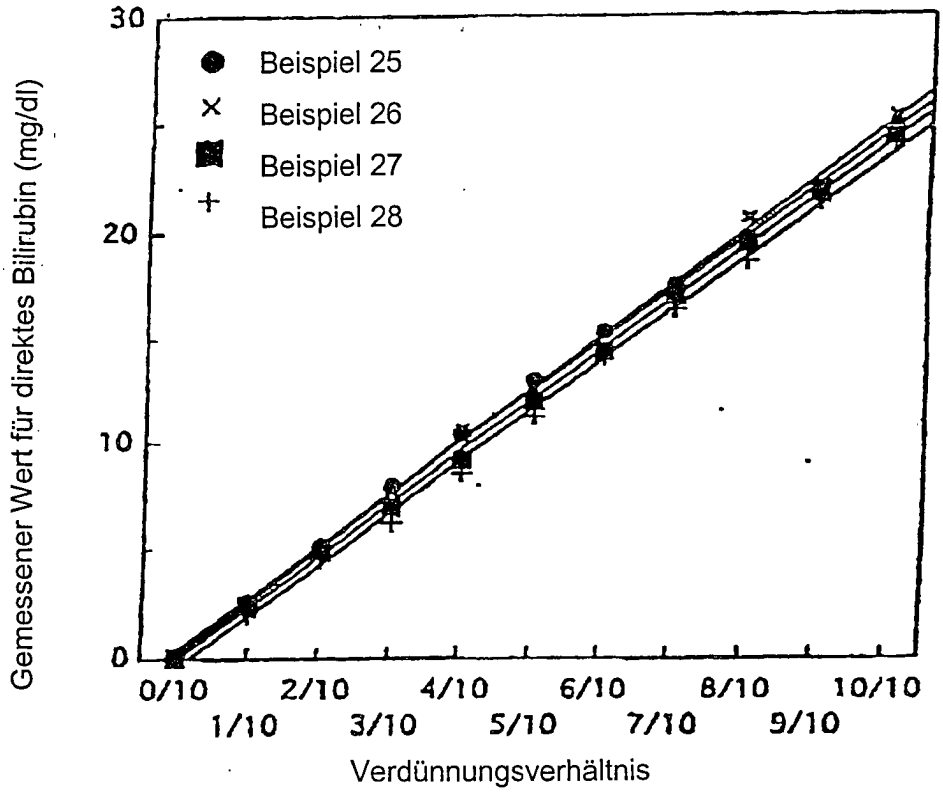
Figur 6


Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
40
30
20
10
0
0/10
1/10
2/10
3/10
4/10
5/10
6/10
7/10
8/10
9/10
10/10
Verdünnungsverhältnis

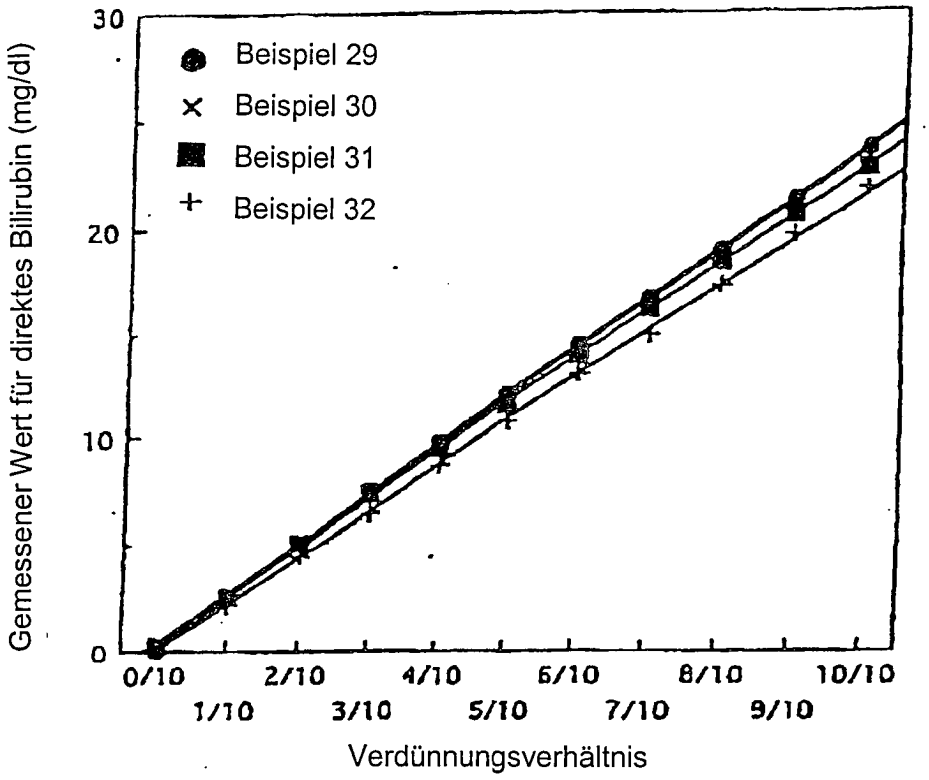
Figur 7


20
10
0
Beispiel 21
Beispiel 22
Beispiel 23
Beispiel 24
Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
0/10
1/10
2/10
3/10
4/10
5/10
6/10
7/10
8/10
9/10
10/10
Verdünnungsverhältnis

Figur 8


30
20
10
0
Beispiel 25
Beispiel 26
Beispiel 27
Beispiel 28
Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
0/10
1/10
2/10
3/10
4/10
5/10
6/10
7/10
8/10
9/10
10/10
Verdünnungsverhältnis

Figur 9


Gemessener Wert für direktes Bilirubin (mg/dl)
30
20
10
0
Beispiel 29
Beispiel 30
Beispiel 31
Beispiel 32
0/10
1/10
2/10
3/10
4/10
5/10
6/10
7/10
8/10
9/10
10/10
Verdünnungsverhältnis