



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 663 094 A5

⑤① Int. Cl. 4: G 01 N 21/25
G 01 N 33/66

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer:	348/84	㉓ Inhaber: Reanal Finomvegyszergyar, Budapest (HU) Dr. Judit Szelényi, Budapest (HU) Janos Földi, Budapest (HU) Dr. Margit Horanyi, Budapest (HU)
㉒ Anmeldungsdatum:	26.01.1984	
㉔ Patent erteilt:	13.11.1987	㉗ Erfinder: Szajani, Béla, Dr., Budapest (HU) Szelényi, Judit, Dr., Budapest (HU) Földi, Janos, Budapest (HU) Horanyi, Margit, Dr., Budapest (HU)
㉕ Patentschrift veröffentlicht:	13.11.1987	㉙ Vertreter: Patentanwälte Schaad, Balass, Sandmeier, Alder, Zürich

⑤④ Verfahren zur Bestimmung des Glukosegehaltes von nicht-enzymatisch glukosylierten Proteinen und ein Kit zur Durchführung des Verfahrens.

⑤⑦ Der Glukosegehalt von nicht-enzymatisch glukosylierten Proteinen wird bestimmt, indem man die in Zellen geschlossenen oder wasserunlöslichen Proteine mit einem ionischen oder nicht-ionischen Detergens in Lösung bringt, die Glukose unter Druck und unter Anwendung einer mindestens 1 N Säure in Form von 5-Hydroxymethyl-furfurol abspaltet, das Reaktionsgemisch deproteiniert, danach das 5-Hydroxymethyl-furfurol mit einer organischen Verbindung, welche mit dem Aldehyd ein farbiges Produkt bildet, kondensiert und schliesslich die Konzentration des erhaltenen Produktes spektrophotometrisch bestimmt.

Ein Kit zur Durchführung des obigen Verfahrens enthält Natriumdodecylsulfat, Oxalsäure, Sulfosalicylsäure und Barbitursäure im Verhältnis von 0,02 : 0,90 : 2,0 : 0,04, bezogen auf 1 Einheit des zu bestimmenden Proteins.

**POOR
QUALITY**

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung des Glukosegehaltes von nicht-enzymatisch glukosylierten Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass man die in Zellen geschlossenen oder wasserlöslichen Proteine mit einem ionischen oder nicht-ionischen Detergens in Lösung bringt, die Glukose unter Druck und unter Anwendung einer mindestens 1 N Säure in Form von 5-Hydroxymethyl-furfurol abspaltet, das Reaktionsgemisch deproteinisiert, danach das 5-Hydroxymethyl-furfurol mit einer organischen Verbindung, welche mit dem Aldehyd ein farbiges Produkt bildet, kondensiert und schliesslich die Konzentration des erhaltenen Produktes spektrophotometrisch bestimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Detergens Natriumdodecylsulfat verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die saure Hydrolyse unter einem Druck von $1,22 \cdot 10^5$ – $2,03 \cdot 10^5$ Pa – vorteilhaft $1,52 \cdot 10^5$ – $1,72 \cdot 10^5$ Pa – mit einer Oxalsäurelösung durchführt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die saure Hydrolyse in Gegenwart eines Katalysators durchführt.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die saure Hydrolyse mit einer Säuremischung durchführt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, dass man die Deproteinisierung mit Sulfosalicylsäure durchführt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, dass man als mit dem Aldehyd ein farbiges Produkt bildende organische Verbindung Barbitursäure verwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die spektrophotometrische Bestimmung bei 398 nm durchführt.

9. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1–7, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Natriumdodecylsulfat, Oxalsäure, Sulfosalicylsäure und Barbitursäure 0,02:0,90:2,0:0,04 beträgt, auf 1 Einheit des zu bestimmenden Proteins bezogen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur spektrophotometrischen Bestimmung von nicht-enzymatisch glukosylierten Proteinen und ein Kit zur Durchführung dieses Verfahrens.

Proteine können an ihren reaktiven Gruppen (insbesondere an den N-Terminalen Aminogruppen und den ϵ -Aminogruppen der Lysin-Seitenkette) aspezifisch in Abhängigkeit vom Glukosegehalt des umgebenden Mediums mehr oder weniger Glukose binden. Dieser, sich in vivo und in vitro abspielende Vorgang ist deshalb von grosser Wichtigkeit, weil bestimmte Eigenschaften der glukosylierten Proteine (z.B. die funktionelle Aktivität, immunologische charakteristische Merkmale und die Stabilität) ändern können. Die Wichtigkeit des in vivo Vorganges ist vor allem der im Diabetes mellitus entstandenen, erhöhten, nicht-enzymatischen Glukosylierung zuzuschreiben, welche in der Bildung der späteren Komplikationen dieser Krankheit eine wesentliche Rolle spielt. Die Verfolgung des in vitro Vorganges ist für die Lagerung und Wiederanwendung von verschiedenen Proteinen, insbesondere von Flüssigkeiten biologischen Ursprungs (z.B. Blut, Milch usw.) wichtig.

Bei der Behandlung von an Diabetes mellitus leidenden Patienten und bei der Verhütung der chronischen Komplikationen ist die Kontrolle des Einstellungsgrades des Blutzuckerspiegels von grundlegender Wichtigkeit. Die aktuelle

Blutzuckerspiegelmessung wird nämlich durch den täglichen Kohlenhydratverbrauch stark beeinflusst, so dass diese Messung über den Kohlenhydratstoffwechsel des Organismus keine zuverlässige Informationen gibt. Auch über die Lage der dem Versuch vorangehenden Periode werden keine Angaben geliefert. Als geeignete Kontrollmethode wird seit einigen Jahren die Bestimmung der Menge des an einer bestimmten Stelle (N-Terminal der β -Kette) glukosylierten Hämoglobins (Hämoglobin A_{1c}; weiterhin HbA_{1c} genannt), d.h. der Menge der schnellen Hämoglobinkomponenten angenommen.

Das HbA_{1c} und die anderen glukosylierten Hämoglobine werden im Laufe der postsynthetischen Glukosylierung gebildet; ihre Menge ist zu dem Glukosegehalt des Blutes proportional. Diese glukosylierten Hämoglobine werden während der Lebensdauer der Erythrozyten ständig gebildet, so dass ihre Menge den durchschnittlichen Wert des etwa dreimonatigen Kohlenhydratstoffwechsels widerspiegelt. Die letztere Angabe stellt den wichtigsten diagnostischen Wert der Bestimmung dar.

Die obigen Verfahren ruhen vor allem auf der Bestimmung der glukosylierten Hämoglobinkomponenten, und zwar der HbA_{1c} Komponente und sind zur Bestimmung von anderen glukosylierten Proteinen ungeeignet (L.A. Trivelli, H.M. Ranny, H.T. Lai: New England Jour. of Med. 1971. Band 284, Seite 353). Die Mehrheit dieser Methoden fusst auf der chromatographischen Trennung des glukosylierten Hämoglobins; es wird deshalb nicht die Gesamtmenge der an Hämoglobin gebundenen Glukose, sondern der auf das nur an der N-terminalen Aminogruppe der -Seitenkette glukosylierte Hämoglobin (HbA_{1c}) kalibrierte Wert angegeben. Die im Handelsverkehr befindlichen Reagenskete sind nur zum obigen speziellen Zweck – d.h. zur Bestimmung von HbA_{1c} – geeignet und sind gegenüber bestimmten Umgebungsfaktoren (z.B. Temperatur der Laboratorien) sehr empfindlich. Die von Flückiger und Winterhalter ausgearbeitete kolorimetrische Methode [FEBS Letters 71, 356 (1976)] ist im Vergleich zur chromatographischen Methode einfach und zur Serienmessungen geeignet. Das Wesen dieser Methode besteht darin, dass die an den Aminogruppen der Proteine durch eine Kondensationsreaktion gebundene und einer Amadori-Umlagerung untergegangene Glukose unter Einwirkung einer sauren Wärmebehandlung in Form von 5-Hydroxymethylfurfurol abgespalten wird; dieses Aldehyd wird mit Thiobarbitursäure bestimmt. Die Methode ist in dieser Form nur zur Bestimmung von zu wasserlöslichen Proteinen gebundener Glukose geeignet. Nach dem ursprünglichen Verfahren wurde die Bestimmung auf das Ergebnis der chromatographischen Methode kalibriert und die Methode wurde deshalb ausschliesslich auf die Bestimmung von HbA_{1c} abgezielt. Es wurde entgegen den obigen Feststellungen erfindungsgemäss gefunden, dass diese Methode auch auf in Zellen geschlossene oder wasserunlösliche Proteine erweitert werden kann, falls man diese Proteine vorher mit einem verdünnten ionischen oder nichtionischen Detergent in Lösung bringt. Die obige Erkenntnis ermöglicht die Bestimmung des Glukosegehaltes von anderen glukosylierten Proteinen ausser dem Hämoglobin.

Andererseits wird die Auswertung des erfindungsgemässen Verfahrens nicht auf die chromatographische HbA_{1c} Methode rückbezogen, sondern es wird ausschliesslich der Extinktionskoeffizient des Glukosederivates und das Verhältnis zwischen der Entstehung und Zersetzung unabhängig vom Protein berücksichtigt. Die Methode wird dadurch auf alle Proteine erweitert und ist zur Bestimmung der Gesamtmenge der an Proteinen gebundenen Glukose geeignet.

Ein weiteres neues Merkmal des erfindungsgemässen Verfahrens liegt darin, dass eine höhere Säurekonzentration als

der entsprechende, bei den bekannten Methoden übliche Wert von 0,6 M kombiniert mit einer unter Überdruck durchgeführten Wärmebehandlung verwendet wird. Die saure Hydrolyse kann mit Hilfe einer einzigen Säure oder mit einem Gemisch von organischen oder anorganischen Säuren vollzogen werden. Man kann gegebenenfalls in Gegenwart eines Katalysators arbeiten. Als Säure kann vorteilhaft Oxalsäure und als Säuregemisch eine Mischung von Oxalsäure und Essigsäure oder Oxalsäure und Schwefelsäure Verwendung finden. Als Katalysator kann z.B. HgCl_2 eingesetzt werden. Diese Ausführungsform des Verfahrens kürzt einerseits die Zeitdauer der Bestimmung ab und führt andererseits zu in sämtlichen Fällen gut reproduzierbaren Ergebnissen.

Es wurde erfindungsgemäss weiterhin gefunden, dass die bei der Deproteinierung bisher ausschliesslich verwendete Trichloressigsäure durch Sulfosalicylsäure erfolgreich ersetzt werden kann. Dieses Reagens ist viel einfacher behandelbar und bietet deshalb technologische Vorteile.

Es wurde weiterhin gefunden, dass die bei den koloremetrischen Bestimmungen bisher ausschliesslich verwendete Thiobarbitursäure durch sämtliche aromatische Verbindungen ersetzt werden kann, welche mit der Aldehydgruppe des bei der sauren Zersetzung gebildeten 5-Hydroxymethylfurfurols kondensieren und dabei unter Bildung eines ausgedehnten Doppelbindungssystems (delokalisierte π -Elektrone) ein farbiges Produkt bilden. Die Barbitursäure hat sich besonders vorteilhaft erwiesen. Es wurde weiterhin gefunden, dass im Fall der mit Thiobarbitursäure durchgeführten Entwicklung die Genauigkeit der Messung erhöht werden kann, falls man die Auswertung bei 360 nm durchführt.

Gegenstand der Erfindung ist also ein Verfahren, welches zur Serienmessung des gesamten gebundenen Glukosegehaltes von irgendwelchen nicht-enzymatisch glukosylierten Proteinen geeignet ist. Das Wesen des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass man die in Zellen geschlossenen oder wasserunlöslichen Proteine mit Hilfe eines ionischen oder nichtionischen Detergens in Lösung bringt, die Glukose aus den gelösten Proteinen durch unter Überdruck durchgeführte saure Hydrolyse in Form von 5-Hydroxymethylfurfural abspaltet, nach Deproteinierung das Aldehyd durch Kondensation mit einer geeigneten organischen Verbindung in ein farbiges Produkt überführt und dessen Konzentration spektrophotometrisch bestimmt.

Gegenstand ist weiterhin ein Kit, mit welchem die Serienmessung stets mit derselben Genauigkeit durchgeführt werden kann.

Die Zusammensetzung des Kits kann variiert werden, weil derselbe chemische Vorgang mit verschiedenen Reagenzien durchgeführt werden kann.

Bei unseren Versuchen wurde zuerst der Wirkungsgrad der Reaktion geprüft; die Behandelbarkeit der verwendeten Reagenzien und die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens wurden jedoch ebenfalls berücksichtigt. Es wurde weiterhin

gefunden, dass das vorteilhafteste Kit zu einer Bestimmung als Detergent 2 ml eines 0,1%igen Natriumdodecylsulfats, als Hydrolyseierungsmittel 1 ml 1 N Oxalsäure, als Deproteinierungsmittel 1 ml 20%iger Sulfosalicylsäure und als das farbige Produkt bildende Verbindung 0,5 ml 0,05 molarer Barbitursäure enthält.

Die vorteilhafte Zusammensetzung des Reagenzienkits für 50 Messungen ist also wie folgt:

100 ml 0,1%iges Natriumdodecylsulfat
50 ml 1 N Oxalsäure
50 ml 20%ige Sulfosalicylsäure
25 ml 0,05 molare Barbitursäure.

Im Reagenskit kann die hämolysierende Lösung anstatt Natriumdodecylsulfat auch ein anderes Detergens (z.B. Triton X 100) enthalten. Die Oxalsäure kann durch 2 N Essigsäure, Schwefelsäure oder eine andere starke Säure ersetzt werden. Zur Entfernung der Proteine kann auch Trichloressigsäure dienen. In der Farbreaktion kann anstatt der Barbitursäure auch Thiobarbitursäure oder eine andere, mit Hydroxymethylfurfural ein farbiges Produkt bildende Verbindung verwendet werden.

Im Reagenskit optimaler Zusammensetzung beträgt das Verhältnis der zur Bestimmung der an Protein verknüpfte Glukose notwendigen Reagenzien wie folgt (auf 1 g Protein bezogen):

Natriumdodecylsulfat: Oxalsäure, Sulfosalicylsäure: Barbitursäure = 0,02:0,9:2,00:0,04.

Weitere Einzelheiten der vorliegenden Erfindung sind den nachstehenden Beispielen zu entnehmen, ohne den Schutzzumfang auf diese Beispiele einzuschränken.

Beispiel 1

Bestimmung des Glukosegehaltes von nichtenzymatisch glukosyliertem Hämoglobin

a) 3 ml hepariniertes Blut werden mit 10 ml physiologischer Salzlösung gewaschen, wonach zu 1 ml gewaschenen Erythrozyten 2 ml einer 0,1%igen Natriumdodecylsulfatlösung zugegeben werden. Die Hämoglobinkonzentration des entstandenen Hämolysats wird bestimmt; zu 2 ml davon wird 1 ml einer 1 N Oxalsäurelösung zugegeben und die Mischung wird bei 112–115°C und unter einem Druck von $1,62 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ 2,5 Stunden lang einer Wärmebehandlung unterworfen. Dem Hydrolysat wird 1 ml einer 20%igen Sulfosalicylsäurelösung unter starkem Schütteln tropfenweise zugegeben (Temperatur 40°C). Die entstandene Suspension wird zentrifugiert und die Lichtabsorption der supernatanten Flüssigkeit bei 398 nm abgelesen (E_1 -Wert). Zu 2 ml dieser Flüssigkeit wird 0,5 ml einer 0,05 molaren Barbitursäurelösung zugegeben und das Gemisch wird bei 40°C 40 Minuten lang inkubiert. Die Mischung wird abgekühlt und die Lichtabsorption binnen 10 Minuten bei 398 nm gegen eine ohne Hämolysat hergestellte Blindprobe abgelesen (E_2 -Wert).

Der Glukosegehalt (G) wird gemäss der folgenden Formel ausgerechnet:

$$G = 2,40 \frac{E_2(398) - 0,8 E_1(398) - 0,20}{(F)} \times 10^{-2} \frac{\text{Mol}}{\text{Glukose/100 ml Hämoglobin}}$$

(F) = Hämoglobinkonzentration (Mole/l).

Die Konstante enthält den molaren Extinktionskoeffizienten der Thiobarbitursäure, den Korrekturfaktor des bei der sauren Zersetzung stattgefundenen 5-Hydroxymethylfurfural-Verlustes und die Verdünnung.

Falls man die Hämoglobinkonzentration mit der Methode von Drabkin bestimmt, zu 5 ml Reagens 0,02 ml Hämolysat zufügt und die Lichtabsorption bei 540 nm misst (E_{540}), ist die Formel wie folgt:

$$G = 4,53 \frac{E_2(398) - 0,8 E_1(398) - 0,20}{(E_{540})} \text{ Mol Glukose/100 ml Hämoglobin}$$

Im Falle von Hämoglobin beträgt der normale Wert 7,5–12,0 Mole Glukose/100 Mole Hemoglobin.

dass man zur Bestimmung der Glukose 0,05 molare Thiobarbitursäure verwendet und die Reaktion bei 443 nm verfolgt.

Zur Auswertung werden die folgenden Formeln verwendet:

b) Man verfährt wie im Beispiel a) mit dem Unterschied,

$$G = 1,5 \frac{E_2(443) - 0,8 E_1(443) - 0,14}{(F)} \times 10^{-2} \text{ Mol Glukose/100 ml Hämoglobin}$$

$$G = 2,83 \frac{E_2(443) - 0,8 E_1(443) - 0,14}{(E_{540})} \text{ Mol Glukose/100 ml Hämoglobin}$$

c) Man verfährt wie im Beispiel a), mit dem Unterschied, dass man die Reaktion bei dem mehr empfindlichen Wert

von 360 nm verfolgt. In diesem Falle werden die folgenden Formeln verwendet:

$$G = 1,05 \frac{E_2(360) - 0,8 E_1(360) - 0,14}{(F)} \times 10^{-2} \text{ Mol Glukose/100 Mole Hämoglobin}$$

bzw.

$$G = 1,98 \frac{E_2(360) - 0,8 E_1(360) - 0,14}{(E_{540})} \text{ Mol Glukose/100 Mole Hämoglobin}$$

Mit Rücksicht darauf, dass nach dieser Methode die an Hämoglobin gebundene Gesamtglukosemenge bestimmt wird, ist das erhaltene Ergebnis höher als der chromatographisch bestimmte oder darauf rückbezogene, international anerkannt verwendete HbA_{1c} Wert. Der Umrechnungsfaktor zwischen den beiden Methoden beträgt G/HbA_{1c} = 1,8.

Beispiel 2

Bestimmung von nicht-enzymatisch glukosylierten Proteinen des Erythrozytenmembrans

a) 10 ml heparinisiertes Blut werden dreimal mit je 50 ml einer physiologischen Salzlösung gewaschen, wonach der Niederschlag mit einem achtfachen Volumen einer eiskalten Hämolyse- und Waschlösung geschüttelt und 5 Minuten lang stehen gelassen wird. Die Suspension wird zentrifugiert, die supernatante Flüssigkeit dekantiert und die zurückgebliebene Membranfraktion viermal gewaschen. Die Hämolyse- und Waschlösungen werden auf die in J. Physiol. 235,

551 (1973) beschriebene Weise hergestellt. Der Proteingehalt des so erhaltenen hämoglobinfreien Membrans wird bestimmt und die Konzentration der Membransuspension auf einen, 2,5 mg/ml Protein entsprechenden Wert eingestellt. Danach werden zu 2,5 ml Membranfraktion 2 ml 0,1%iges Natriumdodecylsulfat und 1 ml 1 N Oxalsäure zugegeben und das Gemisch wird bei 112–115°C unter Druck 2,5 Stunden lang einer Wärmebehandlung unterworfen. Dem Hydrolysat wird 1 ml einer 20%igen Sulfosalicylsäurelösung zugegeben (Temperatur 40°C). Die entstandene Suspension wird zentrifugiert, die Lichtabsorption der supernatanten Flüssigkeit bei 398 nm abgelesen (E₁-Wert). Zu 2 ml davon werden 0,5 ml einer 0,05 molaren Barbitursäurelösung zugegeben und die Mischung wird bei 40°C 40 Minuten lang inkubiert. Das Gemisch wird abgekühlt und die Lichtabsorption bei 398 nm gegen eine ohne Membranfraktion hergestellte Blindprobe innerhalb von 10 Minuten abgelesen (E₂-Wert). Der Glukosegehalt (G) wird mit Hilfe der folgenden Formel ausgerechnet:

$$G = 2,40 \frac{E_2(398) - 0,8 E_1(398) - 0,20}{(F)} \times 10^{-2} \text{ Mol Glukose/100 mg Protein}$$

(F) ist die Konzentration des Membranproteins (in mg/ml). Die Konstante enthält den molaren Extinktionskoeffizient des Barbitursäurederivates, den Korrekturfaktor des bei der sauren Zersetzung stattgefundenen 5-Hydroxymethylfurfurol-Verlustes und auch die Verdünnung.

b) Die Vorbereitung des Proteins und die Glukosebestimmung wird auf die im Paragraph a) beschriebene Weise durchgeführt, mit dem Unterschied, dass zur Bestimmung des Zuckerderivates 0,5 ml einer 0,05 molaren Thiobarbitursäurelösung verwendet wird. Die Reaktion wird bei 360 bzw. 443 nm verfolgt.

Zur Auswertung der Messung werden in Abhängigkeit von der Wellenlänge die folgenden Formeln verwendet:

$$G = 1,05 \frac{E_2(360) - 0,5 E_1(360) - 0,14}{(F)} \times 10^{-2} \text{ Mol Glukose/100 mg Protein}$$

bzw.

$$G = 1,50 \frac{E_2(443) - 0,5 E_1(443) - 0,14}{(F)} \times 10^{-2} \text{ Mol Glukose/100 mg Protein}$$

Beispiel 3

Bestimmung der Glukosylierung von Plasmaproteinen

Das Plasma wird aus dem Blut getrennt. Der Proteingehalt von Blutplasma wird bestimmt und die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt. Zu 2 ml wird 1 ml 1 N Oxalsäurelösung zugegeben und die Mischung bei 112–115°C unter Druck 2,5 Stunden lang einer Wärmebehandlung unterworfen. Dem Hydrolysat wird 1 ml einer 0,6 molaren wässrigen Trichloressigsäurelösung tropfenweise zugegeben, die entstandene Suspension wird zentrifugiert und die Lichtabsorption der supernatanten Flüssigkeit bei 398 nm abgelesen (E_1 -Wert). Zu 2 ml davon wird 0,5 ml einer 0,05 molaren Barbitursäurelösung zugegeben und das Gemisch bei 40°C 40 Minuten lang inkubiert. Das Gemisch wird abgekühlt und die Lichtabsorption binnen 10 Minuten bei 398 gegen eine ohne Plasmaprotein hergestellte Blindprobe abgelesen (E_2 -Wert).

Der Glukosegehalt (G) wird auf die im Beispiel 1a) beschriebene Weise ausgerechnet.

Auch bei der Messung von Plasmaproteinen kann zur Bestimmung des abgespalteten Glukosederivates die Thiobarbitursäurereaktion Verwendung finden. In diesem Falle werden zu 2 ml der supernatanten Flüssigkeit 0,5 ml einer 0,05 molaren Thiobarbitursäurelösung zugegeben. Zur Auswertung werden die Extinktionswerte bei 443 nm abgelesen und die obigen Formeln verwendet.

Beispiel 4

Bestimmung des Glukosegehaltes von nichtenzymatisch glukosyliertem Albumin

Das Plasma wird aus Blut durch Zentrifugieren getrennt. Der pH-Wert des Plasmas wird mit einer 2 molaren Salzsäurelösung auf 6,9 eingestellt. Der Mischung werden unter Rühren 15% Polyäthylenglykol in Form einer 50%igen wässrigen Lösung tropfenweise zugegeben. Die erhaltene Suspension wird 20 Minuten lang gerührt, zentrifugiert und der pH-Wert der supernatanten Lösung wird auf 4,6 eingestellt. Nach Zugabe von 9% festem Polyäthylenglykol innerhalb einer Stunde wird das Gemisch weitere 30 Minuten lang gerührt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren entfernt und in einem Tropfen destillierten Wassers gelöst. Die Lösung wird auf eine, mit Acetatpuffer (pH 5,2) in Aequilibrium gebrachte QAE-Sephadex-Säule (20 × 1,6 cm) aufgebracht. Das Polyäthylenglykol wird durch Waschen entfernt und das Albumin mit einem Acetatpuffer (pH 4,8) eluiert. Der Glukosegehalt der Albuminlösung wird bestimmt und zu 2 ml davon wird 1 ml einer 1 N Oxalsäurelösung gegeben. Das Gemisch wird bei 112–115°C unter Druck 2,5 Stunden lang einer Wärmebehandlung unterworfen. Dem Hydrolysat wird 1 ml einer 20%igen Sulfosalicylsäurelösung (Temperatur 40°C) zugefügt, die erhaltene Suspension wird zentrifugiert und die Lichtabsorption der supernatanten Flüssigkeit bei 398 nm abgelesen (E_1 -Wert). Zu 2 ml davon wird 0,5 ml einer 0,05 molaren Barbitursäurelösung zugegeben und die Mischung wird bei 40°C 40 Minuten lang inkubiert. Das Gemisch wird gekühlt und die Lichtabsorption bei 398 nm innerhalb von 10 Minuten gegen eine ohne Albumin hergestellte Blindprobe abgelesen (E_2 -Wert).

Der Glukosegehalt (G) wird gemäss der folgenden Formel ausgerechnet:

$$G = 2,40 \frac{E_2(398) - 0,8 E_1(398) - 0,2}{(A)} \times 10^{-2} \text{ Mol Glukose/100 mg Albumin}$$

(A) = Albuminkonzentration in mg/ml.

Die Konstante enthält den molaren Extinktionskoeffizienten des Barbitursäurederivates, den Korrektionsfaktor des bei der sauren Zersetzung stattgefundenen 5-Hydroxymethyl-furfurol-Verlustes und auch die Verdünnung.

Beispiel 5

Bestimmung der Glukosylierung von Immunoglobulinen

Aus gerinnungsgehemmten Blut wird das Plasma abgetrennt. Die Immunoglobuline werden nach Ausfällung mit Rivanol durch Chromatographie an QAE-Sephadex gereinigt.

Zu 2 ml einer 5%igen Immunoglobulinlösung wird 1 ml

einer Säuremischung zugegeben (1 N Oxalsäure + 1 N Essigsäure, oder 1 N Oxalsäure + 1 N Schwefelsäure). Die Hydrolyse wird bei 100°C eine Stunde lang durchgeführt und das Protein durch Zugabe von 1 ml 0,6 molarer Sulfosalicylsäure ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wird bei 1500 Umdrehungen per Minute zentrifugiert und zu 2 ml der supernatanten Flüssigkeit wird 0,5 ml einer 0,054 molaren Rezorcin, 2×10^{-3} molaren CuSO_4 Lösung zugegeben. [Vor Zugabe der Reagenzien wird die Lichtabsorption der supernatanten Flüssigkeit bei 405 nm bestimmt (E_1 -Wert)]. Das Reaktionsgemisch wird 15 Minuten lang bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlen wird die Lichtabsorption bei 405 nm wieder abgelesen (E_2 -Wert).

Glukosegehalt (G) = $37,6 (E_2 - E_1 - 0,1)$ Mol/100 Mole

Beispiel 6

Bestimmung der Glukosylierung von Hämoglobin

Zu 1 ml von mit einer physiologischen Salzlösung gewaschenen Erythrozyten werden 2 ml einer 0,1%igen Natriumdodecylsulfatlösung zugegeben. Die Konzentration des Hämolysats wird bestimmt (Hb). Zu 2 ml davon wird 1 ml einer 1 N Oxalsäure - 10^{-4} molaren HgCl_2 Lösung zugefügt und die Mischung wird eine Stunde lang bei 100°C erhitzt.

Das Protein wird mit 1 ml einer 20%igen Sulfosalicylsäurelösung ausgefällt und durch Zentrifugieren entfernt. Die Lichtabsorption der supernatanten Flüssigkeit wird bei 442 nm bestimmt (E_1). Zu 2 ml davon wird 0,5 ml einer 0,05 molaren Thiobarbitursäurelösung zugegeben. Die Mischung wird bei 40°C 40 Minuten lang inkubiert und die Lichtabsorption erneut bestimmt (E_2 -Wert).

$$G = \frac{E_2 - E_1 \times 0,8 - 0,1}{\text{Hb (Mole/l)}} \times 10^{-2} \text{ Mol /100 Mole}$$

Beispiel 7

Schnellverfahren zur Bestimmung des Glukosegehaltes von nicht-enzymatisch glykosyliertem Hämoglobin bei niedriger Temperatur

Mit Heparin gerinnungsgehemmtes Blut wird mit einer physiologischen Salzlösung so lange gewaschen bis die supernatante Flüssigkeit proteinfrei wird. 1 ml von gewaschenen Erythrozyten werden mit 2 ml einer 0,1%igen Natriumdodecylsulfatlösung zweimal gefroren und auftauen gelassen. Die Konzentration der entstandenen Hämoglobinslösung wird bestimmt, zu 2 ml dieser Lösung werden 1 ml 0,3 N Schwefelsäure und 0,1 ml 10^{-4} M HgCl_2 Lösung zugefügt und das Gemisch wird 30 Minuten lang bei 40°C stehengelassen. Der

15

Proteingehalt der Lösung wird mit 1 ml 0,6 molarer Sulfosalicylsäure ausgefällt, und der gebildete Niederschlag durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500 Umdrehungen per Minute entfernt. Die Lichtabsorption der klaren supernatanten Flüssigkeit wird bei 443 nm bestimmt (E_1 -Wert). Zu 2 ml der Lösung wird 0,5 ml einer 0,05 molaren Thiobarbitursäurelösung zugegeben. Die Lösung wird 40 Minuten lang bei 40°C stehengelassen. Nach Abkühlung wird die Lichtabsorption innerhalb von 10 Minuten bei 443 nm erneut bestimmt (E_2 -Wert).

Der Glukosegehalt (G) wird gemäss der folgenden Formel ausgerechnet:

$$G = 1,38 \frac{E_2 - E_1 \times 0,8 - 0,06}{\text{Hb (Mole/l)}} 10^{-2} \text{ Mol Glukose/100 Mole Hb}$$