



Ausschlusspatent

ISSN 0433-6461

(11)

1595 51

Ereilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

Int.Cl.³

3(51) C 12 Q 1/26

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 Q/ 2274 243
(31) P3004129.3

(22) 04.02.81
(32) 05.02.80

(44) 16.03.83
(33) DE

(71) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, MANNHEIM-WALDHOF;DE;
(72) GAUHL, HELMGARD;SEIDEL, HANS,DR.;LANG, GUNTER;ROEDER, ALBERT,DR.;DE;
ZIEGENHORN, JOACHIM,DR.;DE;
(73) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH., MANNHEIM-WALDHOF;DE;
(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN), 1020 BERLIN, WALLSTRASSE 23/24

(54) VERFAHREN UND REAGENZ ZUR BESTIMMUNG VON GLYZERIN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Reagens zur Bestimmung von Glycerol. Es wird angewandt in der medizinischen Diagnostik für die Bestimmung von Triglyceriden im Blut. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens, mit dem eine Verbesserung der Zuverlässigkeit und Spezifität der Bestimmung und eine Vereinfachung der Bestimmungsmethode erzielt werden. Erfindungsgemäß wird zur Bestimmung von Glycerol durch Oxidation mit Sauerstoff in Gegenwart von Glyceroloxidase und Messung des Sauerstoffverbrauchs oder der H₂O₂-Bildung eine Glyceroloxidase aus *Aspergillus spec.* DSM 1729 verwendet. Ein für dieses Verfahren geeignetes Reagens besteht aus Glyceroloxidase aus *Aspergillus spec.* DSM 1729 und einem System zur Bestimmung von H₂O₂ und enthält gegebenenfalls zusätzlich ein Mittel zur Verseifung von verestertem Glycerol.

227424 3

-1-

Berlin, 8. 5. 1981
AP C 12 Q / 227 424/3
58 700 18

Verfahren und Reagens zur Bestimmung von Glycerin

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Reagens zur enzymatischen Bestimmung von Glycerin mittels einer bestimmten Glycerinoxidase, diese selbst und ihre Gewinnung. Die Erfindung wird angewandt in der medizinischen Diagnostik.

Die Bestimmung von Triglyceriden (= Glycerinester von langkettigen Fettsäuren) hat für die medizinische Diagnostik eine erhebliche Bedeutung. Ein erhöhter Triglyceridspiegel im Blut ist ein wesentlicher Risikofaktor der Arteriosklerose. Bei hohen Triglyceridwerten, also Hypertriglyceridämie, kommen Coronarinsuffizienz und Herzinfarkt häufiger vor als bei niedrigen Triglyceridwerten. Hypertriglyceridämie begünstigt das Auftreten von Arteriosklerose und Coronarerkrankungen und muß daher frühzeitig erkannt werden, damit die Behandlung rechtzeitig beginnen kann. Eine rasche und zuverlässig durchführbare Methode zur Bestimmung von Triglyceriden bzw. Glycerin hat daher große Bedeutung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die bekannten und brauchbaren Methoden zur Triglyceridbestimmung basieren auf der enzymatischen Hydrolyse der Triglyceride mittels Lipase/Esterase und Bestimmung des freigesetzten Glycerins, beispielsweise mittels Glycerokinase/Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase oder mittels Glycerinoxidase (DE-AS 2 817 087).

227424 3

8. 5. 1981

AP C 12 Q / 227 424/3

58 700 18

- 2 -

Diese bekannten Verfahren weisen jedoch wesentliche Nachteile auf. So ist bei der Glycerokinase-Methode die Haltbarkeit des Reagens infolge Anwesenheit zahlreicher empfindlicher Coenzyme und Enzyme gering, und es müssen stets Probenleerwert-Bestimmungen durchgeführt werden. Bei der bekannten Glycerinoxidase-Methode liegt ein wesentlicher Nachteil darin, daß das Enzym in den bekannten, dieses enthaltenden Mikroorganismen in recht geringen Mengen vorliegt und zudem eine niedrige spezifische Aktivität in der Größenordnung von 30 U/mg aufweist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist daher die Schaffung eines neuen Verfahrens und eines Reagens zur Bestimmung von Triglyceriden bzw. Glycerin, welches die Nachteile der bisher bekannten Glycerinoxidase-Methode nicht aufweist, deren Vorteile jedoch beibehält, und welches insbesondere die Zuverlässigkeit und Spezifität der Bestimmung verbessert und vereinfacht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine neue Glycerinoxidase in dem Verfahren zur Bestimmung von Glycerin durch Oxidation mit Sauerstoff in Gegenwart von Glycerinoxidase und Messung des Sauerstoffverbrauchs oder der H_2O_2 -Bildung einzusetzen. Erfindungsgemäß wird eine Glycerinoxidase aus *Aspergillus spec.* DSM 1729 verwendet.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Auffindung des Mikroorganismus *Aspergillus spec.* DSM 1729, welcher nicht nur einen um mehrere Zehnerpotenzen höheren Gehalt an Glycerinoxidase aufweist im Vergleich zu bekannten glycerinoxidasehaltigen Mikroorganismen, sondern darüber hinaus auch eine Glycerinoxidase mit wesentlich höherer spezifischer Aktivität enthält.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Sauerstoffverbrauch oder gebildetes H_2O_2 nach hierfür an sich bekannten Methoden bestimmt werden. Vorzugsweise wird der Sauerstoffverbrauch polarometrisch bestimmt
5 mittels Sauerstoffelektrode, da sich dieses Verfahren besonders zur automatischen Durchführung eignet. Besonders geeignet sind hierfür die in den DE-OSen 21 30 340 und 21 30 308 beschriebenen Methoden zur polarometrischen Messung des Sauerstoffverbrauchs in wäßrigem Me-
10 dium. Ein anderes geeignetes Verfahren ist die Gaschromatographie.

Gebildetes H_2O_2 kann sowohl titrimetrisch als auch potentiometrisch, polarographisch und kolorimetrisch so-
15 wie enzymatisch bestimmt werden. Bevorzugt werden die enzymatischen Methoden unter Verwendung von Katalase und Peroxidase, da diese nicht nur äußerst spezifisch und zuverlässig sind, sondern auch mit der Hauptreaktion unter Bildung von Wasserstoffperoxid auf einfachste Wei-
20 se kombiniert werden können. Als besonders geeignet erwies sich insbesondere die Bestimmung mittels Katalase in Gegenwart von β -Diketonen, z.B. Acetylaceton und Methanol bzw. Äthanol oder Methylenglykol sowie die Bestimmung mittels Peroxidase in Gegenwart eines oder meh-
25 rerer Chromogene. Bei der Bestimmung mittels Katalase, Acetylaceton und Methanol wird letzteres zu Formaldehyd oxidiert, der mit Acetylaceton eine Farbreaktion eingeht, die gemessen werden kann. Bei der Bestimmung mittels Peroxidase werden als Chromogen Verbindungen eingesetzt,
30 die nach der Reaktion photometrisch bestimmt werden können.

Ein Beispiel für ein geeignetes Chromogen ist 2,2'-Aminobenzthiazolin-sulfonsäure. Ein anderes bevorzugtes
35 Beispiel ist das Indikatorsystem nach Trinder (Ann.

Clin. Biochem. 6 (1969), 24-27), bei dem Phenol mit 4-Aminoantipyrin (4-AAP) in Gegenwart von POD und unter der Einwirkung von H_2O_2 oxidativ zu einem Farbstoff gekuppelt werden. Anstelle von Phenol können Phenolderivate, Anilinderivate, Naphthol, Naphtholderivate, Naphthylamin, Naphthylaminderivate, Aminochinoline, Hydroxychinoline, Dihydroxyphenylelessigsäure und ähnlich reagierende Substanzen eingesetzt werden. Anstelle von 4-Aminoantipyrin können 4-Aminoantipyrin-Derivate, Phenylendiaminsulfonsäure, MBTH (Methylbenzothiazolonhydrazon), S-MBTH (sulfoniertes Methylbenzothiazolonhydrazon), MBTH- und S-MBTH-Derivate sowie ähnlich reagierende Verbindungen eingesetzt werden.

15

Gegenstand der Erfindung ist weiter ein Reagens zur Bestimmung von Glycerin, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es aus Glycerinoxidase aus *Aspergillus spec.* DSM 1729 und einem System zur Bestimmung von H_2O_2 besteht. Vorzugsweise enthält dieses Reagens zusätzlich ein Mittel zur Verseifung von verestertem Glycerin, insbesondere Lipase/Esterase oder Esterase. Hierfür geeignete Reagenzien sind dem Fachmann bekannt und brauchen nicht weiter beschrieben zu werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das erfindungsgemäße Reagens im wesentlichen aus Glycerinoxidase, Katalase, Acetylaceton, Methanol und Puffer, einzeln oder gemischt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besteht das Reagens im wesentlichen aus Glycerinoxidase, Peroxidase, wenigstens einem Chromogen und Puffer, einzeln oder gemischt. Unter Glycerinoxidase wird hier und im folgenden stets Glycerinoxidase aus *Aspergillus spec.* DSM 1729 verstanden. Als Farbindika-

torsystem wird das System nach Trinder bevorzugt.

Die oben erwähnten bevorzugten Reagenskombinationen können außer den aufgeführten obligaten Bestandteilen
5 zusätzlich übliche Lösungsmittel, Stabilisatoren oder/ und oberflächenaktive Substanzen enthalten. Alle diese Zusatzstoffe sind dem Fachmann bekannt und in Nachweis- systemen für Wasserstoffperoxid üblich. Als Puffer eig-
nen sich zwischen pH 5 und pH 10, vorzugsweise pH 6 und
10 pH 9, puffernde Substanzen. Typische Beispiele für ge- eignete Puffer sind Phosphatpuffer, Tris-Puffer, TRA- Puffer, Acetatpuffer, Citratpuffer und Hepes-Puffer (N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-äthan-sulfonsäure).

15 Vorzugsweise enthalten die oben erwähnten Reagenskombi- nationen die essentiellen Bestandteile in folgenden Men- genverhältnissen:

2 bis 150 U/ml Glycerinoxidase,
20 0,5 bis 100 U/ml Peroxidase,
0,05 bis 20 mMol/l wenigstens eines Chromogens sowie
0,001 bis 0,1 g/ml wenigstens eines oberflächenaktiven
Mittels in Puffer, pH 6 bis 9.

25 Falls die Reagenskombination für die kinetische Be- stimmung verwendet werden soll, werden folgende Mengen- verhältnisse bevorzugt:

100 bis 250 KU/l Glycerinoxidase,
30 5 bis 50 KU/l Peroxidase,
0,2 bis 5 mMol/l Chromogen und gegebenenfalls
1 bis 5 g/l wenigstens eines oberflächenaktiven Mittels
oder ein Vielfaches davon, und Puffer pH 6,8 bis 8,0.

35 Die Züchtung des für die Gewinnung der Glycerinoxidase

verwendeten Mikroorganismus *Aspergillus spec.* DSM 1729 erfolgt nach an sich bekannten Methoden unter Verwendung eines Nährmediums, welches Glycerin, Malzextrakt und Hefeextrakt als wesentliche Bestandteile neben Puffer, Salzen und Spurenelementen enthält. Für die Vorkultur verwendet man vorzugsweise ein Medium mit 1 bis 100 g/l Glycerin, 1 bis 50 g/l Malzextrakt, 1 bis 10 g/l Hefeextrakt, 1 bis 100 g/l Baumwollsaamenmehl sowie 0,2 bis 5 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (oder eine äquivalente Menge eines anderen K_2HPO_4 -Präparats), 0,2 bis 5 g/l KNO_3 , 0,1 bis 5 g/l $CaCO_3$, 0,1 bis 1 g/l NaCl, 0,001 bis 0,1 g/l $FeSO_4$ (als Heptahydrat gemessen) und 0,1 bis 5 g/l $MgSO_4$ (als Heptahydrat gemessen).

15 Für die Hauptkultur wird vorzugsweise ein Medium mit 20 bis 200 g/l Glycerin, 5 bis 100 g/l Malzextrakt, 0,5 bis 5 g/l Hefeextrakt, 0,2 bis 5 g/l Dikaliumphosphat, 0,2 bis 5 g/l KNO_3 , 0,1 bis 5 g/l $CaCO_3$, 0,1 bis 1 g/l NaCl, 0,001 bis 0,1 g/l Ferrosulfat und 0,1 bis 5 g/l
20 Magnesiumsulfat verwendet. Für die einzelnen Salze gilt das oben zur Vorkultur Ausgeführte entsprechend.

Die Vorkultur wird zweckmäßigerweise als Schüttelkultur unter Belüftung bei Temperaturen zwischen 25 und 40°C
25 durchgeführt. Die Kulturdauer liegt im allgemeinen zwischen 20 und 60 Stunden.

Für die Hauptkultur gilt Entsprechendes hinsichtlich Temperatur und Züchtungsdauer. Im Kleinfärmenter werden
30 besonders gute Ergebnisse bei Zufuhr von 0,5 bis 1 l Luft/Minute/l Medium erzielt.

Nach Beendigung der Züchtung wird die Biomasse in üblicher Weise abgetrennt und die Zellen werden aufgeschlossen.
35 Die üblichen Aufschlußmethoden können angewendet

werden, bevorzugt wird mechanisch aufgeschlossen. Aus der Aufschlußlösung werden die unlöslichen Teile entfernt, z. B. durch Abzentrifugieren oder Abnutschen. Die erhaltene Lösung kann als solche bereits direkt für die
5 Glycerinbestimmung eingesetzt werden. Vorzugsweise erfolgt jedoch eine weitere Aufreinigung des Enzyms.

Die Aufreinigung kann nach üblichen biochemischen Methoden der Enzymfraktionierung erfolgen. Als besonders ge-
10 eignet erwies sich jedoch eine in der Enzymfraktionierung unübliche Stufe, nämlich eine Fällung mit Trichloressigsäure. Trichloressigsäurezusatz wird üblicherweise nur zur vollständigen Fällung von Proteinen, also zur Eiweißentfernung eingesetzt, wenn Interesse lediglich
15 an der eiweißfreien Lösung besteht. Überraschenderweise stellte sich jedoch heraus, daß das erfindungsgemäße Enzym durch Trichloressigsäure ohne Aktivitätsverlust und mit hoher Anreicherungswirksamkeit gefällt werden kann. Die Fällung erfolgt dabei zweckmäßig durch Zusatz der
20 Trichloressigsäure bis auf einen pH-Wert im Bereich von 5,4 bis 4,6. Im abgetrennten Niederschlag findet sich das gewünschte Enzym mit einer spezifischen Aktivität von etwa 300 U/mg.

25 Falls eine weitere Reinigung gewünscht wird, erfolgt diese zweckmäßig durch Acetonfällung, anschließende Ammonsulfatfraktionierung sowie abschließende Behandlung mit einem schwach basischen Austauschharz. Bei der Acetonfällung setzt man der Lösung zweckmäßig 0,25
30 bis 0,35 Volumen Aceton zu. Die Ammonsulfatfraktionierung wird zweckmäßig bei einer Molarität von 0,5 bis 2,0 durchgeführt. Sie führt bereits zu einer spezifischen Aktivität von mehr als 800 U/mg. Die Behandlung mit einem schwach basischen Ionenaustauscherharz, vor-
35 zugsweise mit Diäthylaminoäthanolgruppen-haltigem ver-

netztem Dextran (DEAE Sephadex) ergibt nochmals eine 3- bis 10-fache Aufreinigung und führt zu einer Glycerinoxidase mit einer spezifischen Aktivität von etwa 2500 bis 8000 U/mg.

5

Da mit dem erfindungsgemäß eingesetzten Mikroorganismus bereits Aktivitäten von 150000 bis 200000 U/l Kultur erreicht werden, läßt sich auf diese Weise die erforderliche Glycerinoxidasemenge für die Glycerinbestimmung
10 drastisch absenken und die Herstellung entscheidend verbilligen.

Die oben beschriebene Züchtungs- und Reinigungsmethode setzt voraus, daß das Enzym während der Züchtung nicht
15 an das Medium abgegeben wird. Durch Züchtung in Gegenwart von Detergentien läßt sich jedoch wenigstens ein Teil der Aktivität in das Medium überführen. Ebenso ist eine Extraktion aus den geernteten Zellen mit Detergentien möglich. Die Ergebnisse stehen jedoch hinter denen
20 des mechanischen Aufschlusses, beispielsweise in der Hochdruckdispersion, zurück.

Das erfindungsgemäße Enzym unterscheidet sich von bisher bekannten Glycerinoxidasen vor allem durch ein wesentlich niedrigeres Molekulargewicht. Während beispielsweise die bisher für die Glycerinbestimmung verwendete, Glycerinaldehyd bildende Glycerinoxidase ein Molekulargewicht von mindestens 300000 aufweist, beträgt
25 letzteres beim erfindungsgemäßen Enzym nur etwa 90000. Ferner wird die Aktivität des erfindungsgemäßen Enzyms durch Kupfersulfat oder Bleiacetat nicht gehemmt, während SH-Reagenzien inhibieren. Bei der erwähnten bekannten Glycerinoxidase dagegen stabilisieren SH-Reagenzien und Kupfersulfat und Bleiacetat hemmen die Aktivität zu etwa 90 %. Weitere wesentliche Unterschiede be-
35

8. 5. 1981

AP C 12 Q / 227 424/3

58 700 18

227424 3 - 9 -

stehen in einer spezifischen Aktivität zwischen 2000 und 8000 U/mg beim erfindungsgemäßen Enzym gegenüber etwa 30 U/mg beim bekannten Enzym. Auch ist die Stabilität des erfindungsgemäßen Enzyms bei pH-Werten von 5,0 bzw. 10,0 wesentlich besser, und die Aktivität nach 10 Minuten bei 37 °C beträgt unter diesen Bedingungen noch 50 bis 55 % gegenüber 6 bzw. 3 % beim bekannten Enzym.

Das Verfahren und das Reagens der Erfindung eignen sich zur Bestimmung von Glycerin bzw. Glycerinestern (Triglyceriden) in wäßrigen Medien aller Art, wie Lebensmittel-extrakten, Körperflüssigkeiten und insbesondere Serum. Aufgrund der großen Spezifität des Verfahrens wird nur freies Glycerin bestimmt. Die Bestimmung des in erster Linie interessierenden veresterten Glycerins läßt sich nach Verseifung des letzteren durchführen. Die Verseifung erfolgt vorzugsweise enzymatisch, da sie dann gleichzeitig mit der eigentlichen Glycerinbestimmung erfolgen kann.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter. In der beiliegenden Zeichnung zeigen

Fig. 1: eine Eichgerade für die Auswertung der gemessenen Extinktionsdifferenz einer Glycerinstandardlösung in Beziehung zur Glycerin- bzw. Triglyceridkonzentration,

Fig. 2: eine Vorrichtung für die Bestimmung des Glycerins über den Sauerstoffverbrauch.

227424 3

8. 5. 1981

AP C 12 Q / 227 424/3

58 700 18

10
- 9a -

Beispiel 1

1) Züchtung des Mikroorganismus

60 ml einer Vorkultur, enthaltend 10 g/l Glycerin, 10 g/l Malzextrakt, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Baumwollsamemehl, 1,5 g/l $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$, 1 g/l KNO_3 , 2,0 g/l $CaCO_3$, 0,5 g/l NaCl, 0,01 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ und 1,0 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, wurden mit Sporen von *Aspergillus spec.* DSM 1729 beimpft und 48 Stunden bei 30 °C unter Luftzufuhr geschüttelt.

360 ml der so erhaltenen Vorkultur wurden in 15 l eines Hauptkulturmediums eingebracht, welches 100 g/l Glyce-

227424 3

11
- 10 -

rin, 40 g/l Malzextrakt, 2,5 g/l Hefeextrakt, 1,5 g/l
K₂HPO₄·3H₂O, 1,0 g/l KNO₃, 2,0 g/l CaCO₃, 0,5 g/l NaCl,
0,01 g/l FeSO₄·7H₂O und 1,0 g/l MgSO₄·7H₂O enthielt. In
5 10 l Luft/Minute belüftet wurde, erfolgte dann bei 30°C
die Hauptkultur. Nach 22 Stunden Züchtungsdauer betrug
die Aktivität 174800 U/l. Die Aktivitätsmessung erfolg-
te in 0,1 M TRA-Puffer, pH 8, bei 25°C mit p-Chlorphe-
nol und 4-Aminoantipyrin und 546 nm.

10

2) Reinigung des Enzyms

100 g der wie oben beschrieben erhaltenen Trockenmasse
werden in 5 l 0,02 M Acetatpuffer, pH 6,0, suspendiert
15 und über Hochdruckdispersion aufgeschlossen. Anschlie-
Bend wird zentrifugiert und der Niederschlag verworfen.

Dem Überstand wird eine 0,1 molare Trichloressigsäure-
lösung zugefügt, bis ein pH-Wert von 4,8 erreicht ist.
20 Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Er weist eine
spezifische Aktivität von 300 U/mg auf.

3) Feinreinigung

25 Der Niederschlag der Trichloressigsäurefällung wird mit
500 ml 0,1 M Acetatpuffer, pH 6,0, gelöst und mit 0,3
Volumen Aceton bei 0°C versetzt. Der gebildete Nieder-
schlag wird abzentrifugiert und erneut mit 0,1 M Acetat-
puffer, pH 6,0, gelöst. Der so gewonnenen Enzymlösung
30 wird Ammoniumsulfat bis zu einer Molarität von 1,0 zuge-
setzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Seine spe-
zifische Aktivität beträgt ca. 800 U/mg.

Der Niederschlag wird erneut im gleichen Puffer wie bei
35 der Ammonsulfatfraktionierung gelöst, gegen gleichen

227424 3

12
- 41 -

Puffer dialysiert und dann mit DEAE-Sephadex (äquili-
briert gegen den gleichen Puffer) versetzt und eine
Stunde gerührt. Dann wird das Austauscherharz mit glei-
chem Puffer gewaschen und mit 0,2 M Acetatpuffer, pH
5 6,0, fraktioniert eluiert. Die aktiven Fraktionen werden
vereinigt. Die spezifische Aktivität des so erhaltenen
Produkts liegt in den einzelnen Fraktionen zwischen 2500
und 8000 U/mg.

10 B e i s p i e l 2

Bestimmung von Glycerin über H_2O_2 -Bildung

Es werden zwei Reagenzien hergestellt:

15

Reagens 1: 0,1 Mol/l Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 8,0
3,6 mMol/l bzw. 2 g/l Isotridecyläther
4,7 mMol/l bzw. 2 g/l Natriumcholat
10 mMol/l p-Chlorphenol

20

0,5 mMol/l aminosubstituiertes 4-Aminoanti-
pyrin
10 U/ml Peroxidase.

Reagens 2: 500 U/ml Glycerinoxidase.

25

Zur Durchführung der Bestimmung werden 2 ml Reagens 1
und 0,2 ml Reagens 2 in eine Küvette pipettiert. Die
Extinktion E_1 wird am Photometer bei 546 nm abgelesen.
Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l

30

Probe gestartet. Zur Bestimmung von freiem Glycerin
können wäßrige Medien aller Art, wie Lebensmittelex-
trakte, Körperflüssigkeiten und insbesondere Serum als
Probe eingesetzt werden, zur Bestimmung von Triglyceri-
den nach Verseifung.

8. 5. 1981

AP C 12 Q / 227 424/3

58 700 18

227424 3 - ¹³12 -

Nach 20 Minuten Reaktionszeit wird die Extinktion E_2 abgelesen. Die Inkubationstemperatur beträgt 25 °C.

Die Auswertung erfolgt über eine Eichgerade, bei der die gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = E_2 - E_1$ einer Glycerinstandardlösung zur Glycerin- bzw. Triglyceridkonzentration in Beziehung gesetzt wird (Fig. 2 der Zeichnung).

Die Konzentrationen im Testansatz betragen:

0,09 Mol/l Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 8,0

1,8 g/l (3,2 mMol/l) Isotridecyläther

4,3 mMol/l Natriumcholat

9mMol/l p-Chlorphenol

0,45 mMol/l aminosubstituiertes 4-Aminoantipyrin

9 U/ml Peroxidase

45 U/ml Glycerinoxidase.

Beispiel 3

Bestimmung des Glycerins über den Sauerstoffverbrauch

Es wird die in Fig. 1 der Zeichnung dargestellte Vorrichtung verwendet. Die Vorrichtung besteht aus einem Reaktionsgefäß 1 in Form einer zylindrischen Kammer aus transparentem Kunststoff mit einem Innendurchmesser von 143 mm und einer Innenhöhe von 220 mm. Die Kammer enthält 1,8 ml einer Lösung von 18 mM Kaliumjodid, 7,5 mM Ammoniumheptamolybdat, 800 mM Natriumchlorid und 50 U Glycerinoxidase in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8.

In das Reaktionsgefäß ragt der Detektor 3, der aus einer sauerstoffsensitiven Elektrode besteht (WTW: OXI-Elektrode E 016). Der Detektor 3 ist mit dem Analysator 4 verbunden (WTW: Digitalmeter DIGI 610 mit Einschub OXI 610 D). Am Boden des Reaktionsgefäßes 1 befindet sich ein Magnetrührer 5.

8. 5. 1981

AP C 12 Q / 227 424/3

58 700 18

227424 3 - ¹⁴13 -

Durch die Einfüllöffnung 6 werden 20 μ l einer wäßrigen glycerinhaltigen Lösung als Probe 2 zugegeben. Während kräftigem Rühren mit dem Magnetrührer 5 wird die Abnahme der Sauerstoffkonzentration der Lösung gemessen. Der beobachtete Sauerstoffverbrauch wird gegen die Glycerinkonzentration aufgetragen.

Beispiel 4

Kinetische Bestimmung

Proben: wäßrige Standards (Glyceringehalt von 10 bis 100 mg/dl)

Reagens: 0,1 Mol/l Pipes-Puffer, 1,7 Mol/l H_3BO_3 , pH = 7,0
3,0 g/l Isotridecyläther
3,0 g/l Natriumcholat
0,5 mMol/l 4-Aminoantipyrin, aminosubstituiert
10,0 mMol/l p-Chlorphenol
10,0 KU/l Peroxidase
121,0 KU/l Glycerinoxidase

Durchführung am Gemaec-Fast-Analyzer-Analysenautomaten

Temperatur: 25 °C
Meßwellenlänge: 546 nm
Probenvolumen: 10 μ l
Verdünnungsmittel (H_2O): 50 μ l
Reagensvolumen: 500 μ l

Meßzeit: 1. Ablesung: 35 Sek. nach Start
2. Ablesung: 315 Sek. nach Start.

227424 3 - ¹⁵~~14~~ -

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Proben: wäßrige Standards

	Glycerin (UV-Test) (mg/dl)	% Wiederfindung (Glyc-OD, erfindungsgemäß)
5	11	105
	21	101
	32	100
	43	101
10	54	100
	65	99
	76	99
	87	99
	96	102

15

Vorzugsweise wird bei kinetischer Bestimmung mit folgenden Mengenverhältnissen im Reagens gearbeitet:

0,05 bis 0,5 Mol/l Pipes-Puffer, 0,5 bis 2,0 Mol/l

20 H_3BO_3 , pH 6,8 bis 8,0

1 bis 5 g/l Isotridecyläther

1 bis 5 g/l Natriumcholat

0,2 bis 5 mMol/l 4-Aminoantipyrin, aminosubstituiert

5 bis 50 mMol/l p-Chlorphenol

25 5 bis 50 KU/l Peroxidase

100 bis 250 KU/l Glycerinoxidase

Das Beispiel zeigt, daß die Erfindung an den wichtigsten, in einem klinisch-chemischen Routinelabor vorhandenen Analysenautomaten ausführbar ist.

30

8. 5. 1981

AP C 12 Q / 227 424/3

58 700 18

16
- 15 -

227424 3

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Bestimmung von Glycerin durch Oxidation mit Sauerstoff in Gegenwart von Glycerinoxidase und Messung des Sauerstoffverbrauchs oder der H_2O_2 -Bildung, gekennzeichnet dadurch, daß man eine Glycerinoxidase aus *Aspergillus spec.* DSM 1729 verwendet.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Sauerstoffverbrauch polarometrisch gemessen wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß gebildetes H_2O_2 enzymatisch mit Katalase oder Peroxidase bestimmt wird.
4. Reagens zur Bestimmung von Glycerin, gekennzeichnet dadurch, daß es aus Glycerinoxidase aus *Aspergillus spec.* DSM 1729 und einem System zur Bestimmung von H_2O_2 besteht.
5. Reagens nach Punkt 4, gekennzeichnet dadurch, daß es zusätzlich ein Mittel zur Verseifung von verestertem Glycerin enthält.
6. Reagens nach Punkt 4 oder 5, gekennzeichnet dadurch, daß das System zur Bestimmung von H_2O_2 aus Katalase, Acetylaceton, Methanol und Puffer besteht.
7. Reagens nach Punkt 4 oder 5, gekennzeichnet dadurch, daß das System zur Bestimmung von H_2O_2 aus Peroxidase, mindestens einem Chromogen und Puffer besteht.

8. 5. 1981

AP C 12 Q / 227 424/3

58 700 18

227424 3 - 17 -

8. Reagens nach Punkt 7, gekennzeichnet dadurch, daß es 2 bis 150 U/ml Glycerinoxidase, 0,5 bis 100 U/ml Peroxidase, 0,05 bis 20 mMol/l Chromogen und gegebenenfalls 0,001 bis 0,1 g/ml wenigstens eines oberflächenaktiven Mittels oder ein Vielfaches davon und Puffer, pH 6 bis 9, enthält.
9. Reagens nach Punkt 7, gekennzeichnet dadurch, daß es 100 bis 250 KU/l Glycerinoxidase, 5 bis 50 KU/l Peroxidase, 0,2 bis 5 mMol/l Chromogen und gegebenenfalls 1 bis 5 g/l wenigstens eines oberflächenaktiven Mittels oder ein Vielfaches davon und Puffer, pH 6,8 bis 8,0, enthält.
10. Reagens nach einem der Punkte 4 bis 9, gekennzeichnet dadurch, daß es auf einem Trägermaterial, wie Papier, imprägniert vorliegt.