



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 60719

C (45) Patentti myönnetty 10 03 1932
Patent meddelat
(51) Kv.Ik.³/Int.Cl.³ C 12 Q 1/26

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökning	771356
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	28.04.77
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	28.04.77
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	10.12.77
(44) Nähtäväksiapanon ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.11.81
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	09.06.76

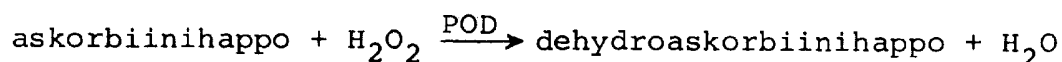
Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE) P 2625834.4

- (71) Boehringer Mannheim GmbH., Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim-Waldhof, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (72) Josef Danninger, Gräfelting, Ulfert Deneke, Peissenberg, Gunter Lang, Tutzing, Gerhard Michal, Tutzing, Peter Röschlau, Seeshaupt, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (74) Berggren Oy Ab
- (54) Menetelmä, jonka avulla voidaan määrittää substraatteja tai entsyymien aktiivisuutta - Förfarande för bestämning av substrat eller enzymaktiviteter

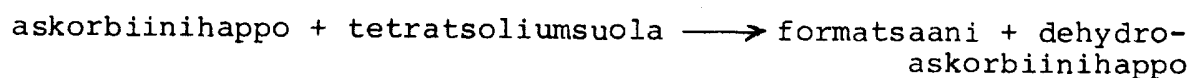
Keksintö koskee menetelmää, jonka avulla voidaan määrittää substraatteja tai entsyymien aktiivisuutta, kun käytetään redoksreaktiota mittausreaktiona, siten että askorbiinihappo ei häiritse suoritettavaa määrittystä.

Kliinisessä ja farmaseuttisessa kemiassa, biokemiassa ja elintarvikekemiassa ovat redoks-reaktiot (eli hapetus-pelkistys-reaktiot) entsyymi- tai substraatti-konsentraatioiden määrittämisessä hyvin tärkeitä. Näiden reaktioiden tulkintaan voidaan käyttää fotometrisiä mittauksia. Jos testisysteemissä on siihen osallistuvien redoks-aineiden lisäksi vielä muita redusoivia aineita, on kuitenkin otettava huomioon häiriöiden mahdollisuus. Erikoisen usein esiintyy koemateriaalissa askorbiinihappoa. Se aiheuttaa voimakkaana pelkistävänä aineena häiriöitä, mikäli tutkimuksen kohteena ovat farmaseuttiset aineet tai fysiologiset nesteet, kuten seerumi tai virtsa, askorbiinihappoa sisältävät kasvismehut tai muut elintarvikkeet, jotka sisältävät askorbiinihappoa tai johon on lisätty sitä. Siten on esim. tunnettua, että askorbiinihappo häiritsee seuraavia reaktioita:

A Reaktiot, joissa annetaan H_2O_2 :n ja vedyn luovuttajan reagoida peroksidaasin (POD) kanssa, häiriytyvät reaktiosta



B Reaktiot, joissa pelkistetään tetratsoliumsuoloja pelkistysaineiden avulla formatsaaneiksi, häiriytyvät reaktiosta

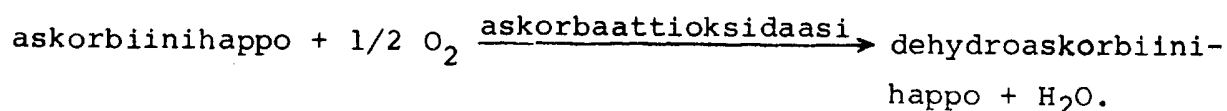


C Reaktiot, joissa fenolit liittyvät nukleofiilisiin reagensseihin hapettavasti, häiriytyvät sen vuoksi, että askorbiinihappo aiheuttaa jostakin vielä selittämättömästä syystä sivureaktioita, niin että syntyy epäyhtenäisiä liityntätuotteita, jotka poikkeavat absorptio-ominaisuuksiensa puolesta normaalissa ja UV-valossa normaalisti muodostuneista liitöntätuotteista.

Askorbiinihapon poistamiseen koemateriaalista eivät yleensä sovellu tavalliset oksidointimenetelmät. Oksidoivat aineet vaikuttavat myös substraatteihin ja entsyymeihin ja tuhoavat niitä. Niiden reduktiotuotteet, useimmiten kaksi- tai kolmiarvoiset metalli-ionit, inhiboivat usein entsyymejä, joita käytetään indikaattorireaktioihin. Askorbiinihapon hävittäminen hapella vaatii voimakkaasti alkalista väliainetta, esimerkiksi 25-prosenttista NaOH:ta. Tämä tuhoaa myös substraatteja ja entsyymejä.

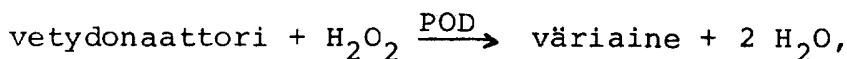
Keksinnön tarkoituksena on saada aikaan sellainen menetelmä, jonka avulla voidaan määrittää substraatteja tai entsyymien aktiivisuutta siten, että askorbiinihappo ei häiritse suoritettavaa määrittystä käytettäessä redoks-reaktiota mittareaktiona, esimerkiksi määrittäyksissä, joissa käytetään H_2O_2 :ta muodostavaa entsyymiä, tetrasoliumsuolaa tai fenolia, joka voi liittyä nukleofiilisten reagenssien kanssa oksidoivasti, ja keksinnön mukainen menetelmä on tunnettu siitä, että määrittäminen suoritetaan pH-arvossa 4,0-8,5, ja että määrittäyksessä on läsnä 0,002-100 U askorbaattioksideasia/ml testiliuosta.

Askorbaattioksideasi katalysoi reaktiota:



Kirjallisuudessa olevien, askorbiinihappo-oksidaasia koskevien tietojen perusteella oli odotettavissa, ettei tätä entsyymiä voida käyttää keksinnön mukaiseen tarkoitukseen. Kaikki tähän asti käytetyt askorbaattioksidaasipreparaatit synnyttävät nimittäin sivureaktiossa H_2O_2 :ta. Tällöin tapahtuu askorbaatti-oksidaasin hyvin nopea inaktivoituminen. Tämä koskee myös kaikin puhtaimpiakin preparaatteja, joissa ei enää voida osoittaa minkäänlaisia epäpuhtauksia ultrasentrifugaalisessa eikä elektroforeettisessa analyysissä (Biochem. 4, 1362-1370 (1965)). Askorbaattioksidaasin inaktivoitumisen katsotaan johtuvan H_2O_2 -muodostuksesta. (Biochemical Copper Proceedings Symposium Harriman New York 1965, sivut 305-337, Biochem. Biophys. Acta 56, 427-439 (1962)). Jälkimmäisten tutkijoiden laskelmien mukaan voi 1 U askorbaattioksidaasia liuoksessa, jossa on 1 mmol/l askorbiinihappoa synnyttää $0,7 \times 10^{-2}$ mmol/l H_2O_2 :ta. Tällaisia askorbaattikonsentraatioita on koeliuoksissa usein läsnä. Muodostunut H_2O_2 on käytettävissä ilman muuta entsyymaattisiin reaktioihin, kuten katalaasin esimerkissä osoitettiin.

Systeemissä



jota käytetään H_2O_2 :n fotometriseen osoittamiseen, se aiheuttaa molaarisen ekstinktiiovakion ollessa noin $20 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ekstinktiokeron 0,14. Koska normaaleissa fotometrisissä reaktioissa mitta-alue on noin 0,1-1,00, aiheutuu tässä liian suuri virhe. Samalla tavoin häiriytyvät reaktiot, joissa käytetään H_2O_2 :n asemasta orgaanisia hydroperoksiedeja ja POD:n asemasta hemoglobiinia tai muita hapetuskatalysaattoreja.

Mutta paitsi tätä H_2O_2 :n aiheuttamaa virhettä, tunnetaan edellä viimeksi mainitusta kirjallisuuskohdasta, että askorbiinihapon reaktio pysähtyy jo kauan ennen sen täydellistä poistamista.

Tämän on täytynyt olla erikoisen hankalaa kaikissa niissä redoksreaktioissa, joissa syntyy H_2O_2 :ta, koska tämän H_2O_2 :n täytyy toisaalta vielä nopeuttaa entsyymien inaktivoitumista ja toisaalta H_2O_2 :n uudelleen muodostuminen askorbaattioksidaasin kautta johtaa etukäteen vaikeasti ennustettaviin ilmiöihin. Sen vuoksi on erittäin yllättävää, että odotusten vastaisesti on mahdollista poistaa täydelleen askorbaatin läsnäolosta aiheutuvat häiriöt li-

säämällä askorbaattioksidaasia ilman että esiintyisi toisia häiriöitä, jotka taas tekisivät tyhjäksi askorbaatin poistamisesta koituvan edun.

Keksinnön mukaista menetelmää käytetään etupäässä entsymaattisissa reaktioissa, varsinkin sellaisissa, joissa muodostuu H_2O_2 :ta, siis reaktioissa, joiden katalysaattoreina käytetään oksidaaseja kuten glukooxioksidaasia, urikaasia, kolesteriinioksidaasia yms., edelleen reaktioissa, joissa pelkistetään tetratsolium-suoloja ja reaktioissa, joissa fenolit liittyvät oksidoivasti nukleofiilisiin reagoiviin aineisiin. Käytettävä askorbaattioksidaasimäärä riippuu odotettavissa olevasta askorbiinihapon määrästä kokeessa. Yleensä lisätään 0,002 - 100 U askorbaattioksidaasia/ml, etupäässä 0,01 - 30 U/ml testiliuosta kohti. Reaktion pH-arvo mukautetaan ensi sijassa siihen osallistuvan tai osallistuvien entsyymien tarvitseman pH-arvon mukaan. Keksinnön mukaisessa menetelmässä ovat pH-arvot välillä 4,0-8,5 osoittautuneet sopiviksi. Keksinnössä käytetään edullisimmin askorbaattioksidaasia, joka on saatu zucchini-nimisistä pikku kurkuista (*Cucurbita pepo medullosa*). Mutta myös muunlaista alkuperää olevaa askorbaattioksidaasia voidaan käyttää.

Keksinnön kohteena on myös reagenssi, jonka avulla voidaan määrätä substraatteja tai entsyymien aktiivisuutta, käyttäen redoks-reaktiota mittareaktiona, ja reagenssi on tunnettu siitä, että se sisältää tavanomaisten määritysreagenssien lisäksi askorbaattioksidaasia.

Parhaana pidetyt tämän kaltaiset reagenssit sisältävät askorbaattioksidaasin lisäksi, mikäli glukooxi on määritettävä substraatti, peroksidaasia, glukooxioksidaasia, o-dianisidiinia tai atsino-di-3-etyyllibentsyyliatiatsoliinisulfonaatti-(6):tta yhdessä puskurin kanssa, tai heksokinaasia, glukooxi-6-fosfaattidehydrogenaasia, diaforaasia, NADP:tä, tetratsoliumsuolaa kuten INT:ä 3(4-jodifenylyli)-2-(4-nitrofenylyli)-5-fenylyli-2H-tetrasoliumkloridia ja puskuria. Kun virtsahappo on määritettävä substraatti, muodostuu reagenssi etupäässä peroksidaasista, urikaasista, fenolista kuten esimerkiksi 2,4-di-kloori-fenolista, aminoantipyriinistä ja puskurista. Kun kyseessä on glutamaattimääritys, muodostuu reagenssi edullisimmin glutamaattidehydrogenaasista, diaforaasista, NAD:stä, INT:stä ja puskurista. Tyrosiinia varten pidetään parhaana tyrosinaasia, 3-metyyli-6-kaliumsulfonyyli-bentstiatsolonihiydratson-(2):a, pyrokatekiinimääritykseen difenolioksidaasia, 3-metyyli-6-kaliumsulfonyyli-bentstiatsolonihiydratson-(2):a, kulloinkin puskurin kanssa. Kaikki edellä mainitut substraattien määrityksissä käytetyt reagenssit ovat tunnettuja. Niiden

tilalla voidaan kuitenkin käyttää myös muita tunnettuja, substraattien tai entsyymien määrityksissä tunnettuja reagenssisysteemejä.

Keksinnön mukaista reagenssia käytetään erityisesti pikadiagnostisissä välineissä. Tällaisissa pikadiagnostisissa välineissä ovat erilaiset, menetelmän suoritukseen tarvittavat reagenssit tavallisesti joko impregnoituina imukykyiseen kantajaan tai ne on sivelty jonkin sopivan sideaineen kanssa kantajafolion päälle. Parhaana pidetty toteutusmuoto on tällöin se, että askorbaattioksidaasi lisätään muiden reagenssien seokseen, joka impregnoidaan tämän jälkeen imukykyiselle kantajalle. Tällä tavoin saadaan esimerkiksi glukosin osoittamiseen virtsassa testipapereita, joissa ei ole käytännöllisesti katsoen lainkaan askorbiinihapon häiritsevää vaikutusta (esimerkiksi saksalaisen hakemusjulkaisun 23 38 932 mukaan, veren osoittamiseen virtsassa (esimerkiksi saksalaisen hakemuksen 24 60 903-8 tai saksalaisen patentin 22 35 152 mukaan) ja veren osoittamiseen ulosteista. Voidaan pitää erittäin yllättävänä, että askorbaattioksidaasi pysyy tehokkaana ja kestää varastointia niissä testipapereissa, joilla osoitetaan veri virtsassa. Nämä testipaperit sisältävät nimittäin ylimääriä orgaanisia hydroperoksiedeja, joiden voisi odottaa inaktivoivan askorbaattioksidaasia samalla tavoin kuin H_2O_2 .

Mutta askorbaattioksidaasi voidaan sivellä myös erilliselle kantajalle, joka yhdistetään muut reagenssit sisältävään kantajaan, esimerkiksi pannaan sen päälle, liimataan siihen kiinni tai suljetaan sen kanssa yhteen. Tässä tapauksessa soveltuu askorbaattioksidaasin kantajaksi erikoisesti ns. vesiliukoinen paperi (esimerkiksi saksalaisen hakemusjulkaisun 24 36 598 mukainen), jonka ansiosta värireaktiot näkyvät erikoisen hyvin toiset reagenssit sisältävällä kantajapaperilla. Tämä toteutusmuoto on erityisesti silloin edullinen, kun reagenssiyhdistelmässä on mukana sellaisia aineita, jotka eivät sovellu yhteen askorbaattioksidaasin kanssa, esimerkiksi voimakkaasti happamia reagensseja, jollaisia käytetään menetelmissä urobilinogeenin, bilirubiinin ja nitriitin määrittämiseksi.

Edellä olevissa suoritustavoissa käytetään 5000 U:n saakka askorbaattioksidaasia ml:aa kohti impregnoimisliuosta, etupäässä 2000 U saakka/ml impregnoimisliuosta reagenssien valmistuksessa. Vähempi kuin 1 U/ml ei yleensä takaa haluttua efektiä.

Voidaan tehdä myös siten, että impregnoidaan kantajamateriaalin erillään olevia alueita askorbaattioksidaasilla ja muilla testireagensseilla. Tällöin on tarkoituksenmukaista, että kantaja joutuu tutkittavan liuoksen kanssa kosketuksiin siten, että liuos koskettaa ensiksi askorbaattioksidaasi-pitoista aluetta ja imeytyy sieltä siihen alueeseen, joka sisältää muut testireagenssit.

Erään toisen toteutusmuodon mukaan sidotaan askorbaattioksidaasi Kantajamateriaaliin niiden tunnettujen menetelmien mukaan, joita käytetään kiinnitettäessä entsyymiä liukenemattomiin kantajiin. Sopivia menetelmiä tunnetaan saksalaisista hakemusjulkaisuista n:ot 17 68 512, 21 28 743, 22 60 185, 22 60 184, 24 26 988, 26 03 158 ja 19 15 970.

Parhaina pidettyjä keksinnön mukaisia menetelmiä ovat glukoosin määrittäminen käyttäen peroksidaasia ja glukoosioksidaasia ja o-dianisidiinia tai 2,2'-atsino-di-3-etyyllibentstiatsoliinisulfonaatti-(6):ta (ABTS), glukoosin määrittäminen heksokinaasi/glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasi-menetelmän mukaan, virtsahapon osoittaminen käyttäen fenolia, aminoantipyriiniä, peroksidaasia ja urikaasia, tyrosiinin tai pyrokatekiinin määrittäminen käyttäen SMBTH:ta (4-metyyli-6-kaliumsulfonyyli-bentstiatsolonihydratsoni-(2):ta ja tyrosinaasia tai difenolioksidaasia.

Seuraavat esimerkit kuvaavat tarkemmin keksintöä.

Esimerkki 1

Glukoosin määrittäminen käyttäen o-dianisidiinia, peroksidaasia (POD) ja glukoosioksidaasia (GOD), mittaus fotometrin avulla, aallonpituus 432 nm, mittauslämpötila: 25°C.

Kyvetti n:o	1	2	3	4	5
Fosfaattipuskuri pH 7,01 M	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
o-dianisidiini 5 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
POD, 180 U/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Glukoosi-liuos 1 mg/ml	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

Kyvetti n:o	1	2	3	4	5
Askorbiinihappo- liuos 10 mM	-	0,1	0,01	0,1	0,01
Vesi	0,12	0,02	0,11	-	0,09
Askorbaatti-oksi- daasi 500 U/ml	-	-	-	0,02	0,02
Annetaan seistä 1 min lämpötilassa 25°C, luetaan E ₁ , sen jälkeen aloitetaan käyttäen					
COD 70 U/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Annetaan seistä 30 min lämpötilassa 25°C, luetaan E ₂ , lasketaan E ₂ -E ₁ = Δ E					
Δ E	0,541	0,010	0,316	0,540	0,543

Kyvetti 1 vastaa häiriötöntä mittausta (ei askorbiinihappoa). Kyvetit 2 ja 3 osoittavat, että 1 tai 0,1 μmoolia askorbaattia estää testin lähes täysin tai 41,5-prosenttisesti, kyvetit 4 ja 5 osoittavat täydellisen häiriön poiston näissä askorbaatti-konsentraatioissa lisätessä kuhunkin 3,33 U/ml askorbaatti-oksidaasia.

Esimerkki 2

Glukoosin osoittaminen käyttäen 2,2'-atsino-di- $\sqrt{3}$ -etyyli-bentstiatsooliinisulfonaatti-(6) $\sqrt{7}$:a (ABTS), POD:tä ja GOD:ia fotometrissä, aallonpituus: 432 nm, mittauslämpötila: 25°C.

Kyvetti n:o	1	2	3	4	5
Fosfaattipuskuri pH 5,6 0,1 M	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75
ABTS 50 mM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
POD 250 U/ml	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Glukoosi-liuos 0,1 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Askorbiinihappo- liuos 1 mM	-	0,1	0,01	0,1	0,01
Vesi	0,12	0,02	0,11	-	0,09
Askorbaatti-oksi- daasi 500 U/ml	-	-	-	0,02	0,02

Annetaan seistä 1 min 25^o:ssa, luetaan E₁, aloitetaan käyttäen

GOD 70 U/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
-------------	-----	-----	-----	-----	-----

Annetaan seistä 30 min 25^oC:ssa, luetaan E₂, lasketaan E₂-E₁ = Δ E

Δ E	0,505	0,000	0,40	0,502	0,504
-----	-------	-------	------	-------	-------

Kyvetti 1 vastaa häiriötöntä mittausta (ei askorbaattia). Kyvetit 2 ja 3 osoittavat, että 0,1 tai 0,01 μmol askorbaattia estävät testin täydellisesti tai 21-prosenttisesti.

Kyvetit 4 ja 5 osoittavat täydellisen häiriön poiston näistä askorbaattikonsentraatioista, joihin on lisätty kuhunkin 3,33 U/ml askorbaattioksideasia.

Esimerkki 3

Virtsahapon osoittaminen käyttäen fenolia, aminoantipyriiniä, POD:tä ja urikaasia analyysiautomaatissa (Autoanalyzer).

Testin periaate

Virtsahappo + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{urikaasi}}$ allantoini + H₂O₂

2 H₂O₂ + 2,4-dikloorifenoli + 4-aminoantipyriini $\xrightarrow{\text{POD}}$ kinoidiväriaine + 2 H₂O

Liuosten valmistus

1 Askorbaatti-oksideasi-reagenssi

600 ml:aan kahdesti tislattua vettä liuotetaan pullon 1 sisältö. Lisätään 0,3 ml "Brij-35" (polyetyleeniglykolilauryylietteri, Firma Atlas Chemie). Säilyy tummassa pullossa noin 4^oC:ssa neljä viikkoa, noin 25^oC:ssa yhden viikon.

2 Urikaasi-reagenssi

800 ml:aan kahdesti tislattua vettä liuotetaan pullon 2 sisältö. Lisätään 2,0 ml Brij-35. Säilyy tummassa pullossa noin 4^oC:ssa neljä viikkoa, noin 25^oC:ssa yhden viikon.

Liuosten konsentraatiot

pullo 1 50 mM fosfaattipuskuria, pH 5,6

askorbaatti-oksideasia ➔ kuviossa 2 ilmoitetuissa määrissä.

pullo 2 31 mM Tris/sitruunahappo, pH 8,9

urikaasi $\geq 0,08$ U/ml

POD $\geq 0,015$ U/ml

3,0 mM 2,4-dikloorifenolia, 4,0 mM 4-aminoantipyriniä.

Määrittämiseen suorittamista varten asennetaan automaatin letkusysteemi kuviossa 1 esitetyn virtauskaavan mukaisesti.

Kuviossa 2 on esitettynä graafisesti kokeiden tulokset.

Esimerkki 4

Glukoosin osoittaminen käyttäen HK/G6P-DH, NADP, INT ja diaforaasia fotometrissä. Mittauksen aallonpituus: 492 nm, inkuboimislämpötila: 25°C.

Kyvetti n:o	1	2	3
Fosfaattipuskuri, pH 7,5 0,1 M	1,7	1,7	1,7
NADP/INT kumpaakin 1 mg/ml	0,1	0,1	0,1
diaforaasi 5 U/ml	0,1	0,1	0,1
glukoosi-liuos 0,05 mg/ml	0,1	0,1	0,1
askorbaatti-liuos 10 mM	-	0,01	0,01
askorbaatti-oksidaasi 35 U/ml	-	-	0,03
vesi	0,04	0,03	-
Annetaan seistä 3 min 25°C:ssa, luetaan E_1 , aloitetaan käyttäen			
HK/G6P-DH-liuosta, kutakin 56 U/ml			
Annetaan seistä 15 min, luetaan E_2 , lasketaan $E_2 - E_1 = \Delta E$			
ΔE	0,234	0,307	0,230

Kyvetti 1 vastaa häiriötöntä mittausta.

Kyvetti 2 osoittaa, että 0,01 μ mol askorbaattia antaa 34 % liian korkeita testiarvoja, malja 5 osoittaa, että 0,5 U/ml askorbaatti-oksidaasia poistaa tämän häiriön täydellisesti.

Esimerkki 5

Glutamaatin määrittäminen käyttäen GldH, NAD/INT/diaforaasia fotometrissä. Mittauksen aallonpituus 492 nm, lämpötila 25°C.

Kyvetti n:o	1	2	3	4	5
Fosfaattipuskuri pH 5,6, 0,01 mM	1,30	1,20	1,29	1,18	1,27
Glutamaatti-liuos 0,2 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Askorbaatti-liuos 5 mM	-	0,1	0,01	0,1	0,01
Askorbaatti-oksidaasi 100 U/ml	-	-	-	0,02	0,02

Annetaan seistä 3 min 25°C:ssa, sitten pipetoidaan yksittäisiin kyvetteihin.

0,2 M TRA, 0,05 M

Kaliumfosfaattipuskuri, pH 8,6, jossa

on 1,5 % Triton-X-100	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
NAD-liuos, 5 mg/ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
diaforaasi-liuos 10 U/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GIDH 1000 U/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Luetaan E_1 , aloitetaan reaktio käyttäen

INT-liuosta, 2 mg/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
-------------------------	------	------	------	------	------

Annetaan seistä 15 min 25°C:ssa, luetaan E_2 , lasketaan $E_2 - E_1 = \Delta E$

ΔE	0,184	0,560	0,380	0,186	0,182
------------	-------	-------	-------	-------	-------

Kyvetti 1 vastaa häiriötöntä mittausta.

Kyvetit 2 ja 3 osoittavat, että 0,5 tai 0,05 μ mol askorbaattia antaa testin arvoksi noin 700 tai noin 100 % liian korkeat arvot.

Kyvetit 4 ja 5 osoittavat tämän häiriön täydellisen poistamisen käytettäessä 0,73 U/ml askorbaatti-oksidaasia.

Esimerkki 6

Tyrosiinin määrittäminen käyttäen 3-metyyli-6-kaliumsulfonyyli-bentsiatsoloni-hydratsoni-(2):ta (SMBTH) ja tyrosinaasia fotometrissä, mittauksen aallonpituus 492 nm, mittauslämpötila 25°C.

Kyvetti: n:o	1	2	3
Fosfaattipuskuri, pH 5,2 0,25 M	2,77	2,77	2,77
SMBTH 0,1 M	0,05	0,05	0,05
Askorbiinihappo-liuos 10 mM	-	0,1	0,1
Vesi	0,12	0,02	-
Askorbaatti-oksidaasi 500 U/ml	-	-	0,02
Tyrosinaasi 60 U/ml	0,05	0,05	0,05
Annetaan seistä 1 min 25°C:ssa, luetaan E ₁ , aloitetaan käyttäen			
Tyrosiinia 2 mM	0,05	0,05	0,05
Annetaan seistä 1 h 25°C:ssa, luetaan E ₂ , lasketaan E ₂ -E ₁ = Δ E			
Δ E	1,113	0,728	1,100

Kyvetti 1 vastaa häiriötöntä mittausta, kyvetissä 2 alentaa 1,0 μmol askorbaattia teoreettisen arvon noin 35 %:lla, maljassa 3 on tämä häiriö poistettu täydelleen käyttäen 3,33 U/ml askorbaatti-oksidaasia.

Esimerkki 7

Pyrokatekiinin määrittäminen käyttäen SMBTH ja difenoli-oksidaasia.

Kyvetti n:o	1	2	3
Fosfaattipuskuri, 0,25 M pH 5,2	2,80	2,70	2,68
SMBTH 0,1	0,05	0,05	0,05
Pyrokatekiini 0,5 M	0,10	0,10	0,10
Askorbaatti-liuos 20 mM	-	0,1	0,1
Askorbaatti-oksidaasi 500 U/ml	-	-	0,02
Annetaan seistä 1 min 25°C:ssa, luetaan E ₁ , aloitetaan käyttäen			
Difenoli-oksidaasia 200 U/ml	0,05	0,05	0,05
Annetaan seistä 17 min 25°C:ssa, luetaan E ₂ , lasketaan E ₂ - E ₁ = Δ E			
Δ E	0,890	0,485	0,896

Kyvetti 1 vastaa häiriötöntä mittausta.

Kyvetissä 2 alentaa 2,0 μmol askorbaattia teoreettisen arvon noin 47 %:lla, tämä häiriö on poistettu täydelleen maljassa 3 lisäämällä 3,33 U/ml askorbaatti-oksidaasia.

Esimerkki 8

Peroksidaasin (POD) määrittäminen käyttäen 2,2'-atsino-di- $\sqrt{3}$ -etyyli-bentstiatsoliinisulfonaatti-(6) $\sqrt{7}$:a (ABTS), fotometrimittauksella aallonpituudella 432 nm lämpötilassa 25°C.

Kyvetti n:o	1	2	3	4	5
Fosfaattipuskuri pH 5,6, 0,1 mol/l	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75
ABTS 50 mmol/l	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
POD 0,1 U/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Askorbaatti 1 mmol/l	-	0,1	0,01	0,1	0,01
H ₂ O	0,12	0,02	0,11	-	0,09
Askorbaattioksideasi 500 U/mol	-	-	-	0,02	0,02
Annetaan seistä 1 min 25°C:ssa, aloitetaan käyttäen					
H ₂ O ₂ 10 mmol/l	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Määritetään $\Delta E/\text{min}$					

Kyvetti 1 vastaa häiriötöntä mittausta, joka osoittaa $\Delta E/\text{min}$ noin 0,052 heti mittauksen alusta. Kyvetissä 2 askorbaattihäiriö on ilmeinen, koska 30 minuutin aikana ei saada mittaustulosta. Kyvetin 3 pieni askorbaattipitoisuus inhiboi täydellisesti reaktiota 2 minuutin ajan, ja vielä seuraavan 2 minuutin aikana reaktionopeudella on tasaantumisvaihe ennen kuin se saavuttaa maksimiarvon. Kyveteissä 4 ja 5 on tämä häiriövaikutus täydellisesti poistettu käyttämällä 3,3 U/ml askorbaattioksideasia.

Esimerkki 9

Testipaperi, jonka avulla voidaan osoittaa glukoosi virtsassa

Suodatinpaperi kastetaan liuokseen, jonka kokoomus on seuraava ja kuivataan 50°C:ssa:

1,2 m sitraattipuskuria pH 5	50,0 ml
9-(γ-dimetyyliaminopropyyli)-6-kloori-3-amino-karbatsoli-dihydrokloridia	0,75 g
Glukoosioksidaasia (104 U/mg)	0,25 g
Peroksidaasia (63 U/mg)	0,05 g
Askorbaatti-oksidaasia (1000 U/ml)	1,00 g
Vettä	100,0 ml

Testipaperi reagoi glukoosia sisältävien virtsojen kanssa antaen värisävyjä, jotka ovat punaoranssista mustanpunaiseen. 2 minuutin reaktioajan jälkeen antavat virtsat, joiden glukoosipitoisuus on sama ja jotka sisältävät askorbiinihappoa 150 mg/dl saakka käytännöllisesti katsoen samat reaktiovärit.

Testipapereissa, joiden kokoomus on analoginen, mutta jotka eivät sisällä askorbaatti-oksidaasia, ovat reaktiovärit riippuen glukoosipitoisuudesta askorbiinihappokonsentraatioissa alkaen 50 mg/dl heikentyneet tai täysin peitossa.

Esimerkki 10

Testipaperi, jonka avulla voidaan osoittaa virtsassa oleva veri

Suodatinpaperi impregnoidaan peräkkäin seuraavilla liuoksilla ja kuivataan 40°C:ssa.

Liuos 1

1,2 m sitraattipuskuria pH 5,25	35,0 ml
Etyleenidiamiinitetraetikkahappoa, dinatriumsuola	0,1 g
Dioktyylinatriumsulfosukkinaattia	0,5 g
2,5-dimetyyliheksaani-2,5-dihydroperoksidia (noin 70-prosenttista)	1,6 g
Fosforihappotrimorfolidia	12,7 g
Askorbaatti-oksidaasia (300 U/ml)	0,3 g
Metanolia	30,0 ml
Vettä	ad 100,0 ml

Liuos 2

3,3',5,5'-tetrametyyllibentsidiiniä	0,3 g
Fenantridiiniä	0,2 g
Tolueeni/petrolieetteri (30:70)	ad 100,0 ml

Tällä testipaperilla voidaan osoittaa 5 erytrosyytin olemassaolo mm³:ssa virtsaa myös silloin, kun mukana on 30-50 mg askorbiinihappoa/100 ml. Testipaperilla, jonka kokoomus on sama, mutta jossa ei ole askorbaatti-oksidaasia ei enää onnistuta osoittamaan sitä, jos mukana on 10-20 mg askorbiinihappoa/100 ml.

Esimerkki 11Testipaperi A

Testipaperi kuten esimerkissä 10 ilman askorbaatti-oksidaasia.

Testipaperi B

Vesiliukoinen paperi karboksimeetyyliselluloosaa (pintayksikön paino 60 g/m²) kastellaan 20-prosenttisella jääetikan metanoliliuoksella neutralisoimista varten ja kuivatetaan. Sen jälkeen pirskotellaan siihen askorbaattioksidaasin vesiliuosta (10³ U/ml) ja kuivataan heti.

Testipaperi B pannaan testipaperi A:n päälle ja molemmat suljetaan polyesterifolion ja nailonverkon väliin. Tutkittava virtsa tiputetaan näin valmistetun testiliuskan päälle.

Tulokset vastaavat esimerkissä 10 saatuja.

Esimerkki 12

Testipaperi, jonka avulla voidaan osoittaa ulosteessa oleva veri
Suodatinpaperi impregnoidaan peräkkäin seuraavilla liuoksilla ja kuivataan 40°C:ssa.

Liuos 1

1,2 m sitraattipuskuria, pH 5,25	10 ml
Askorbaatti-oksidaasia 300 U/ml	0,3 g
Vettä	ad 100,0 ml

Liuos 2

Guajak-hartsia	3 g
Tolueenia	ad 100,0 ml

Liuos suodatetaan ja vain suodosta käytetään impregnoimiseen.

Saadaan testipaperi, johon sivellään ulostetta. Jos kääntöpuolelle tiputetaan 3-prosenttista vetyperoksidin vesiliuosta, niin saadaan sininen väri, jos uloste sisältää noin 2 % verta. Tämä väri tulee esiin myös askorbiinihappo-pitoisissa ulosteissa (noin 15 mg/100 g), kun taas testipapereissa ilman askorbaattioksidaasia jää vain näissä tapauksissa tulematta esiin.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, jonka avulla voidaan määrittää substraatteja tai entsyymien aktiivisuutta siten, että askorbiinihappo ei häiritse suoritettavaa määrittystä käytettäessä redoks-reaktiota mittareaktiona, esimerkiksi määrittäyksissä, joissa käytetään H_2O_2 :ta muodostavaa entsyymiä, tetrasoliumsuolaa tai fenolia, joka voi liittyä nukleofiilisten reagenssien kanssa oksidoivasti, t u n n e t t u siitä, että määrittäminen suoritetaan pH-arvossa 4,0-8,5 , ja että määrittäyksessä on läsnä 0,002-100 U askorbaattioksideasia/ml testiliuosta.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään askorbaattioksideasia, jota on saatu zucchini-kurkuista (Cucurbita pepo medullosa).
3. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen menetelmän suorittamiseksi tarkoitettu reagenssi, jonka avulla voidaan määrittää substraatteja tai entsyymien aktiivisuutta käyttämällä redoks-reaktiota mittareaktiona, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tavantomaisten määrittäysreagenssien lisäksi askorbaattioksideasia.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi glukoosin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää peroksideasia, glukoosioksideasia, o-dianisidiinia tai 2-atsino-di-3-etyyli-bentstiatsoliinisulfonaatti-(6):ta, puskuria ja askorbaattioksideasia.
5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi virtsahapon määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää peroksideasia, urikaasia, fenolia kuten 2,4-dikloorifenolia, aminoantipyriiniä, puskuria, ja askorbaattioksideasia.
6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi glukoosin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää heksokinaasia, glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasia, nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidifosfaattia (NADP), diaforaasia, tetratsoliumsuolaa, puskuria ja askorbaattioksideasia.
7. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi glutamaatin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää glutamaattidehydrogenaasia, diaforaasia, nikotiiniamidi-adeniini-dinukleo-

tidiä, tetratsoliumsuolaa, puskuria ja askorbaattioksidaasia.

8. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi tyrosiinin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tyrosinaasia, 3-metyyli-6-kaliumsulfonyyli-bentstiatsoloni-hydratsoni-(2):a, puskuria ja askorbaattioksidaasia.

9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi, bentskatekiinin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää difenolioksidaasia, 3-metyyli-6-kaliumsulfonyyli-bentstiatsoloni-hydratsoni-(2):a, puskuria ja askorbaattioksidaasia.

10. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi käytettäväksi substraatin määrittämiseen, t u n n e t t u siitä, että substraatin määrittämiseen tarkoitettut reagenssit ja askorbaattioksidaasi on impregnoitu imukykyiselle kantaja-aineelle, edullisesti paperille.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että vesiliukoinen, levymäinen kantajamateriaali on kyllästetty askorbaattioksidaasilla, ja veteen liukenematon, levymäinen, imukykyinen kantaja-aine on kyllästetty substraatin määrittämiseen tarkoitetuilla reagensseilla, ja että vesiliukoinen ja veteen liukenematon kantajamateriaali on kerrostettu päällekkäin.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukaisen reagenssin käyttö glukoosin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että käytetään glukoosioksidaasilla, peroksidaasilla, askorbaattioksidaasilla, 9-(γ -dimetyyliaminopropyyli)-6-kloori-3-aminokarbatsolisulolalla ja puskurilla kyllästettyä kantajapaperia.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukaisen reagenssin käyttö virtsassa olevan veren määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että käytetään etyleenidiaminotetraetikkahapposuolalla, dioktyylinatrium-sulfosukkinaatilla, 2,5-dimetyyliheksaani-2,5-dihydroperoksidilla, fosforihappotrimorfolidilla, askorbaattioksidaasilla, 3,3', 5,5' tetrametyylibentsidiinillä, fenantridiinillä ja puskurilla kyllästettyä paperia.

14. Patenttivaatimuksen 10 mukaisen reagenssin käyttö ulosteessa

olevan veren määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että käytetään askorbaattioksidaasilla, guajakhartsilla ja puskurilla kylästettyä paperia.

Patentkrav

1. Förfarande för bestämning av substrat eller enzymaktiviteter sålunda att askorbinsyra icke stör bestämningen, vid användning av redox-reaktion som indikationsreaktion, till exempel vid bestämningar, där man använder ett H_2O_2 -bildande enzym, ett tetrazoliumsalt eller en fenol som kan reagera oxidativt med nukleofila reagenser, k ä n n e t e c k n a t av att bestämningen utföres vid ett pH-värde av 4,0-8,5, och att 0,002-100 U askorbatoxidas/ml testlösning är närvarande vid bestämningen.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att man använder askorbatoxidas utvunnen från zucchini-gurkor (*Cucurbita pepo medullosa*).
3. Reagens för utförande av förfarandet enligt patentkravet 1, med hjälp av vilken substrat eller enzymaktiviteter kan bestämmas genom användning av en redox-reaktion som indikationsreaktion, k ä n n e t e c k n a d av att denna utöver de sedvanliga bestämningsreagenserna innehåller askorbatoxidas.
4. Reagens enligt patentkravet 3 för bestämning av glukos, k ä n n e t e c k n a d av att denna innehåller peroxidas, glukosoxidas, o-dianisidin eller 2-atsino-di-3-etylbenstiazolinsulfonat(6), buffert och askorbatoxidas.
5. Reagens enligt patentkravet 3 för bestämning av urinsyra, k ä n n e t e c k n a d av att denna innehåller peroxidas, urikas, fenol, såsom 2,4-diklorfenol, aminoantipyrin, buffert och askorbatoxidat.
6. Reagens enligt patentkravet 3 för bestämning av glukos, k ä n n e t e c k n a d av att denna innehåller hexokinas, glukos-6-fosfatdehydrogenas, nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat (NADP), diaforas, tetrazoliumsalt, buffert och askorbatoxidas.
7. Reagens enligt patentkravet 3 för bestämning av glutamat, k ä n n e t e c k n a d av att denna innehåller glutamat-

dehydrogenas, diaforas, nikotinamid-adenin-dinukleotid, tetrazoliumsalt, buffert och askorbatoxidas.

8. Reagens enligt patentkravet 3 för bestämning av tyrosin, k ä n n e t e c k n a d av att denna innehåller tyrosinas, 3-metyl-6-kaliumsulfonfyl-benstiazolon-hydrazon-(2), buffert och askorbatoxidas.

9. Reagens enligt patentkravet 3 för bestämning av benskatekin, k ä n n e t e c k n a d av att denna innehåller difenoloxidas, 3-metyl-6-kaliumsulfonfyl-benstiazolon-hydrazon-(2), buffert och askorbatoxidas.

10. Reagens enligt patentkravet 3 för användning vid bestämning av substrat, k ä n n e t e c k n a d av att reagenserna för bestämning av substratet och askorbatoxidasen impregnerats på absorberande bärarmaterial, fördelaktigt papper.

11. Reagens enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a d av att ett vattenlösligt, skivformat bärarmaterial är impregnerat med askorbatoxidas, och ett i vatten olösligt, skivformigt absorberande bärarmaterial är impregnerat med reagenserna för bestämning av substratet, och att det vattenlösliga och det i vatten olösliga bärarmaterialet är skiktade på varandra.

12. Användning av reagens enligt patentkravet 10 för bestämning av glukos, k ä n n e t e c k n a d av att man använder ett med glukosoxidas, peroxidas, askorbatoxidas, 9-(γ -dimetylamino)propyl-6-klor-3-aminokarbazolsalt och buffert impregnerat bärarpapper.

13. Användning av reagens enligt patentkravet 10 för bestämning av urin i blodet, k ä n n e t e c k n a d av att man använder ett med etylendiaminotetraättiksyrasalt, dioktylnatriumsulfosuccinat, 2,5-dimetylhexan-2,5-dihydroperoxid, fosforsyratrimorfolid, askorbatoxidas, 3,3', 5,5'-tetrametylbensidin, fenantridin och buffert impregnerat papper.

14. Användningen av reagens enligt patentkravet 10 för bestämning av blod i avföring, k ä n n e t e c k n a d av att man använder ett med askorbatoxidas, guajakharts och buffert impregnerat papper.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Fig. 1

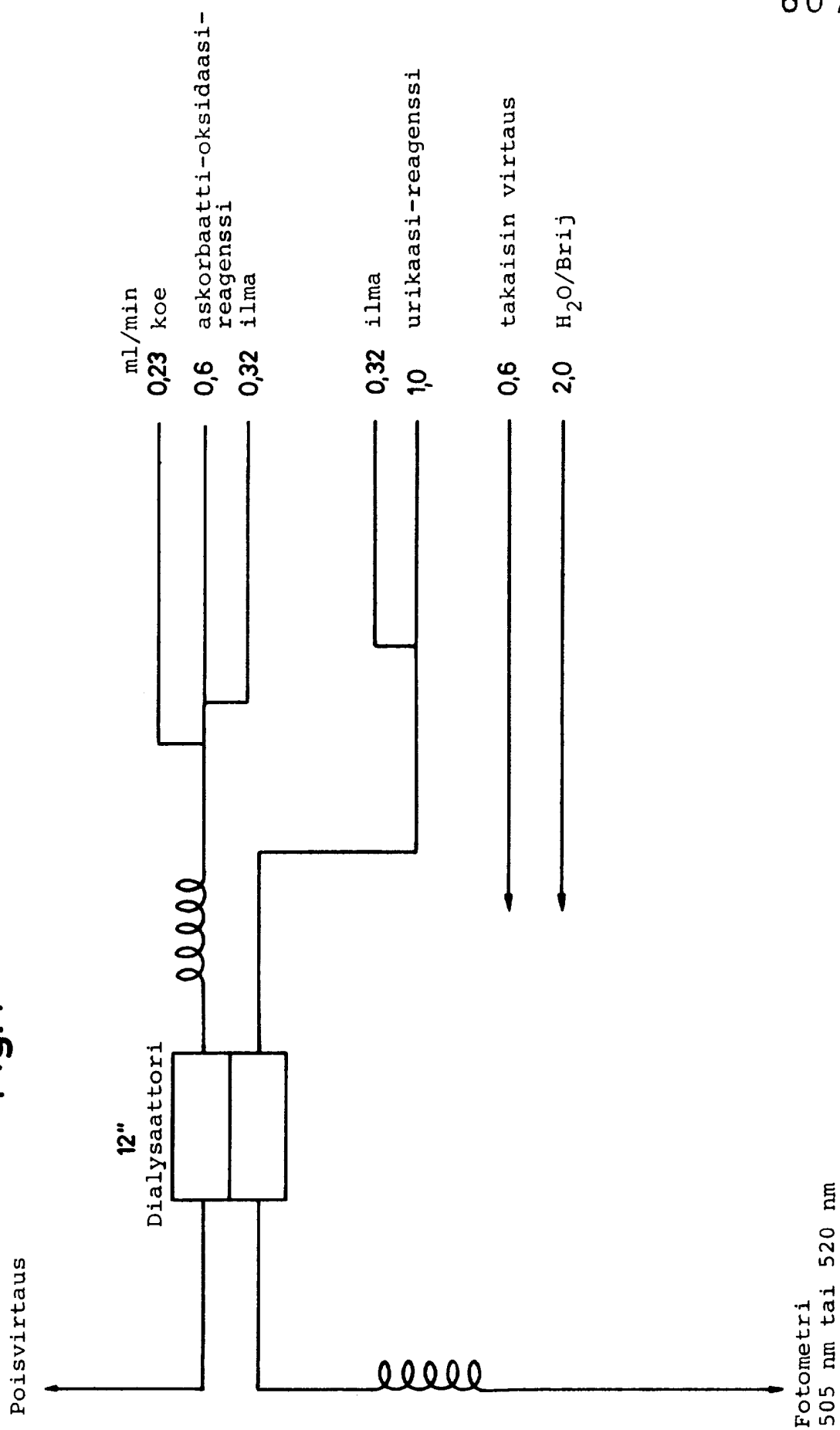
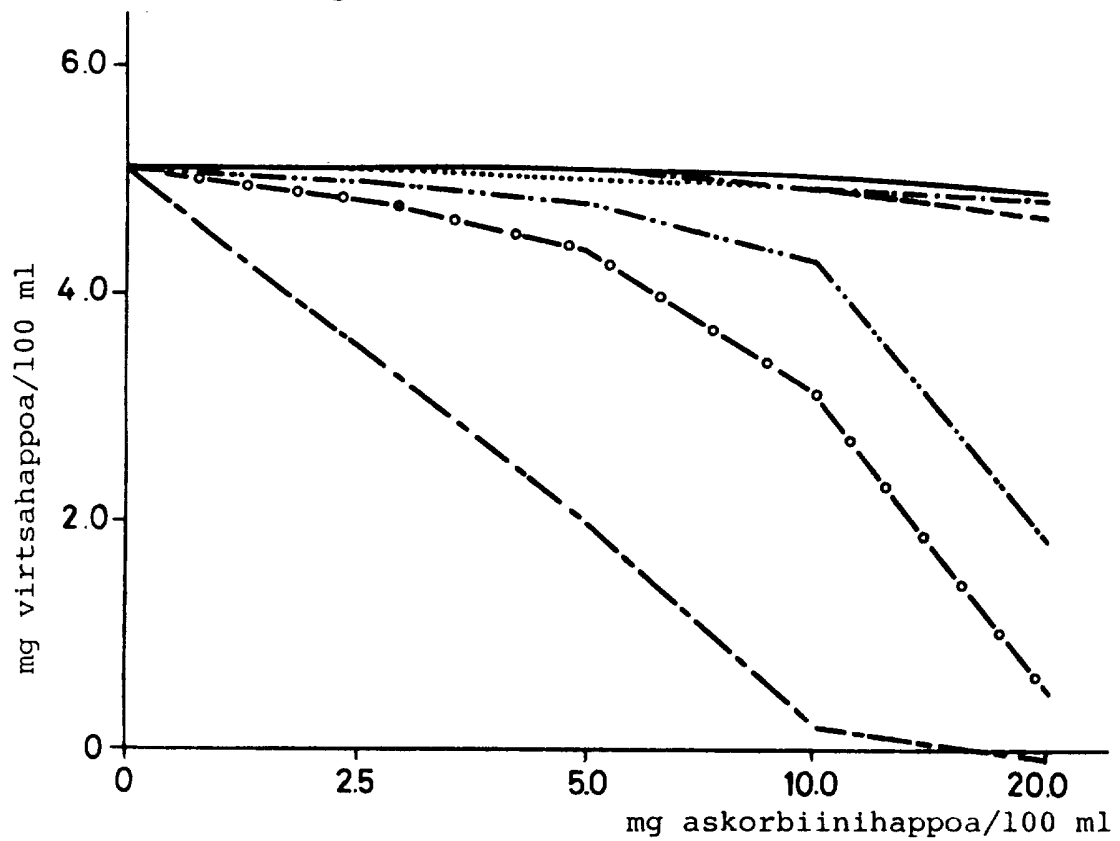


Fig. 2



— 0,9 U/ml askorbaatti-oksidaasia
 - - - 0,67 U/ml "
 0,45 U/ml "
 - - - 0,225 U/ml "
 - · - · 0,112 U/ml "
 - o - o 0,056 U/ml "
 - - - Puskuri ilman askorbaatti-oksidaasia