



Wirtschaftspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

210 991

Int.Cl.³

3(51) G 01 N 33/48

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) WP G 01 N/ 2412 744

(22) 01.07.82

(44) 27.06.84

(71)

AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN, DD

(72)

MOHR, PETER, PROF. DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.; HANKE, THOMAS, DIPL.-CHEM.;
EBERT, BERND, DR. RER. NAT. DIPL.-BIOPHYS.; KAHRIG, ERWIN, DR. SC. NAT. DIPL.-PHYS.; DD;
KALLIES, KARL-HEINZ, OBERING.; PLASCHNICK, DIETER, DIPL.-CHEM.; DD;

(54) **INDIKATORSYSTEM ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON ASKORBINSAEURE NEBEN GLUKOSE**

(57) Die Erfindung betrifft ein Indikatorsystem zur quantitativen Bestimmung von Ascorbinsäure neben Glukose in Teststreifen. Dieses Indikatorsystem enthält erfindungsgemäß einen Semichinonimin-Farbstoff der allgemeinen Formel I, wobei R = H oder ein Alkyl-, Aryl-, Alkoxy- bzw. Phenoxy-Rest bedeutet, sowie eines der im WPG 01 N/236 500/4 beschriebenen Fixiermittel. Der Farbstoff I und das Fixiermittel werden in einem Bindemittel (z. B. Gelatine) oder einem Vliesmaterial (z. B. Papier) eingebracht und auf eine inerte Unterlage aufgetragen. Zur gleichzeitigen Bestimmung von Glukose und des Ascorbatfehlers wird auf einen Teststreifen a) das Indikatorsystem zur Bestimmung von Ascorbinsäure und b) das Indikatorsystem nach WPG 01 N/236 500/4 zur Bestimmung von Glukose unmittelbar nebeneinander angeordnet, nach Kontakt mit der Probe erfolgt eine Auswertung über eine Eichkurve. Formel I

Prof. Dr. P. Mohr

T. Hanke

Dr. B. Ebert

Dr. E. Kahrig

K.-H. Kallies

D. Plaschnick

-1-

"Indikatorsystem zur quantitativen Bestimmung von Ascorbinsäure neben Glukose"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Indikatorsystem zur quantitativen Bestimmung von Ascorbinsäure neben Glukose in Teststreifen. Eine Anwendung der Erfindung ist vorzugsweise in der Medizin für diagnostische und Kontrollzwecke, aber auch in der Nahrungsgüterwirtschaft, der mikrobiologischen Industrie und der Landwirtschaft möglich.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Für die Bestimmung von Glukose in Harn, Blut, Serum, Plasma, aber auch Glukose enthaltenden Lösungen anderen Ursprungs sind in den vergangenen Jahren verschiedene enzymatische Nachweisverfahren als Küvettentests (Meyer-Bertenrath: Enzymdiagnostik, Theorie und Praxis enzymatischer Analysen; Die Medizinische Verlagsgesellschaft; Marburg/Lahn 1976) oder Streifentests (R. Haeckel: Rationalisierung des medizinischen Laboratoriums, GIT-Verlag; Darmstadt, 1979) entwickelt und in die Praxis eingeführt worden. Bei vielen dieser Systeme erfolgt die Glukosebestimmung über eine Farbbildung, wobei die erzielte Farbintensität mit der Glukosekonzentration in der Probenlösung korreliert. Allen diesen Tests ist gemeinsam, daß zunächst gemäß Reaktion (1) Glukose mit O_2 unter dem Einfluß des Enzyms Glukoseoxidase zu Glukonolakton und H_2O_2 reagiert. Letzteres wird genutzt, um in einer durch das Enzym Peroxidase katalysierten Reaktion (2) eine chromogene Verbindung in einen Farbstoff umzuwandeln:



Als effektives Chromogen wurden z. B. o-Tolidin (nach WP G 01 N/236 500/4 bildet diese Verbindung unterhalb pH 5 einen radikalischen Farbstoff, der durch Fixiermittel stabilisiert wird); o-Dianisidin oder Kombinationen von 4-Aminoantipyrin und 3,5-Dichlorphenol bzw. N,N'-Diethylanilin vorgeschlagen. Bei letzteren erfolgt in Reaktion (2) eine oxidative Verknüpfung beider Komponenten zur farbgebenden Verbindung. Durch Substanzen wie Ascorbinsäure (aber auch reduzierend wirkende Arzneimittel oder Fremdstoffmetaboliten) kann der Nachweis gestört werden, wenn diese

- (a) ebenfalls mit H_2O_2 reagieren oder
- (b) den gebildeten Farbstoff unter Farbänderung bzw. Entfärbung reduzieren.

So ist z. B. bekannt, daß Ascorbinsäure mit H_2O_2 reagiert, wobei unterschiedliche Produkte wie Dehydroascorbinsäure und radikalische Derivate gebildet werden. Die Reaktion läßt sich daher in ihrer Stöchiometrie nicht immer eindeutig beschreiben. Hierdurch aber sind diese Tests mit einem Fehler behaftet, der auch als Ascorbatfehler bezeichnet wird und der sich auf die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Testergebnisses selbst dann noch negativ auswirken kann, wenn es sich um eine halbquantitative Bestimmungsmethode handelt.

Um diesen Fehler erfassen zu können, hat man insbesondere bei verschiedenen Teststreifen für die Harndiagnostik zusätzlich zu dem für die Glukosebestimmung vorgesehenen Bereich einen weiteren für den Nachweis von Ascorbinsäure und anderen störend wirkenden, reduzierenden Substanzen geeigneten Testbereich aufgebracht (H. Kohl, Laboratoriumsblätter 27 (1977) 103). Auch hier liegt dem Nachweis wiederum eine Farbreaktion zugrunde, wobei durch reduzierend wirkende Substanzen eine Farbbildung oder -vertiefung, zumeist jedoch eine Farbabnahme

(z. B. partielle Entfärbung von 2,6-Dichlorphenol-indophenol = (Tillmann's Reagenz)) bewirkt wird. Der Grad der Farbänderung korreliert hier mit der in der Probe vorhandenen Menge an reduzierenden Substanzen.

Bei Farbstoffen, die durch oxidative Kupplung gebildet werden, sind Verbindungen (Farbbildner und Kuppler) empfohlen worden, bei denen die Farbbildung nach Reaktion (2) schneller erfolgt als die Reaktion von Ascorbinsäure und anderen reduzierenden Substanzen mit H_2O_2 (R. H. White-Stevens Clin. Chem. 28, 578 (1982); R. H. White-Stevens and L. R. Stover Clin. Chem. 28, 589 (1982)). Die Farbstoffe selbst sind jedoch nicht reduzierbar.

Nachteilig bei allen diesen Verfahren ist, daß sich die zum Nachweis von Glukose bzw. Ascorbinsäure verwendeten Reaktionen grundsätzlich voneinander unterscheiden und damit der ökonomische und technologische Aufwand bei der Herstellung entsprechender Streifen ansteigt. Darüber hinaus muß die Glukosebestimmung und die Ermittlung des Ascorbatfehlers, wenn es sich um einen quantitativ auswertbaren Test handelt, bei verschiedenen Wellenlängen vorgenommen werden, woraus zusätzliche Anforderungen an die Auswertetechnik gestellt werden.

Bei schnellreagierenden Farbbildnern und Kupplern handelt es sich zumeist um schwerzugängliche, chemische Substanzen, deren Störanfälligkeit unter den erforderlichen Testbedingungen auch noch nicht hinreichend bekannt ist.

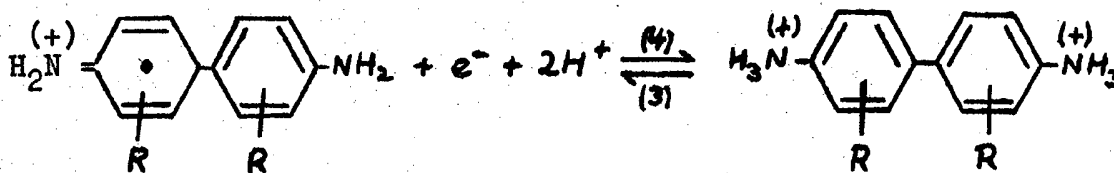
Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, das Verfahren zur Ermittlung des Ascorbatfehlers in Ergänzung zum Glukosenachweis mittels Teststreifen so weiterzuentwickeln, daß für beide Nachweise die gleiche Indikationsreaktion genutzt werden kann und damit bessere Voraussetzungen für eine quantitative Auswertbarkeit gegeben sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Testsystem zu entwickeln, das neben der quantitativen Bestimmung von Glukose in Harn, Blut, Plasma, Serum usw. auch eine präzise Erfassung des Askorbatfehlers erlaubt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß auf eine inerte Unterlage in einem Bindemittel (z. B. Gelatine) oder einem Vliesmaterial (z. B. Papier) ein Biphenylderivat wie z. B. o-Tolidin und eines der in WP G 01 N/236 500/4 beschriebenen Fixiermittel eingebracht werden. Durch Behandeln mit einer H_2O_2 -Lösung, die außerdem das Enzym Peroxidase enthält, wird unterhalb $pH = 5$ gemäß (3) ein Semichinonimin-Farbstoff der Formel I (z. B. Tolidinblau) gebildet, welcher durch das Fixiermittel chemisch stabilisiert und in Abhängigkeit von dessen Struktur durch wäßrige Probenlösungen nicht ausgewaschen werden kann. Der Farbstoff läßt sich in bekannter Weise auch elektrochemisch durch anodische Oxidation von Biphenylderivaten darstellen. Durch Ascorbinsäure oder andere im Untersuchungsmaterial vorhandene reduzierende Substanzen erfolgt eine Reduktion des Farbstoffes gemäß (4), wobei die Farbabnahme mit der Größe des Askorbatfehlers in der Probe korreliert.



I gefärbt (stabilisiert durch Fixiermittel)

II ungefärbt

wobei R = H oder ein Alkyl-, Aryl-, Alkoxy- bzw. Phenoxyrest sein kann. Der Glukosenachweis selbst kann nach Zusatz der Enzyme Glukoseoxidase und Peroxidase in bekannter Weise nach WP G 01 N/236 500/4 gemäß Reaktion (3) vorgenommen werden.

Zur gleichzeitigen Ermittlung des Glukosegehaltes einer Probe und des Askorbatfehlers wird die Erfindung zweckmäßigerweise so ausgestaltet, daß auf einem inerten Streifen (z. B. PVC oder Polyester)

- (a) eine Schicht aus transparentem oder Vliesmaterial, in der die Verbindung II (z. B. o-Tolidin), das Fixiermittel sowie die Enzyme Glukoseoxidase und Peroxidase eingebracht wurden und unmittelbar daneben
- (b) eine Schicht aus gleichem Material, die den gemäß Reaktion (3) gebildeten Farbstoff I und ein Fixiermittel enthalten, angeordnet wird (Abb. 1).

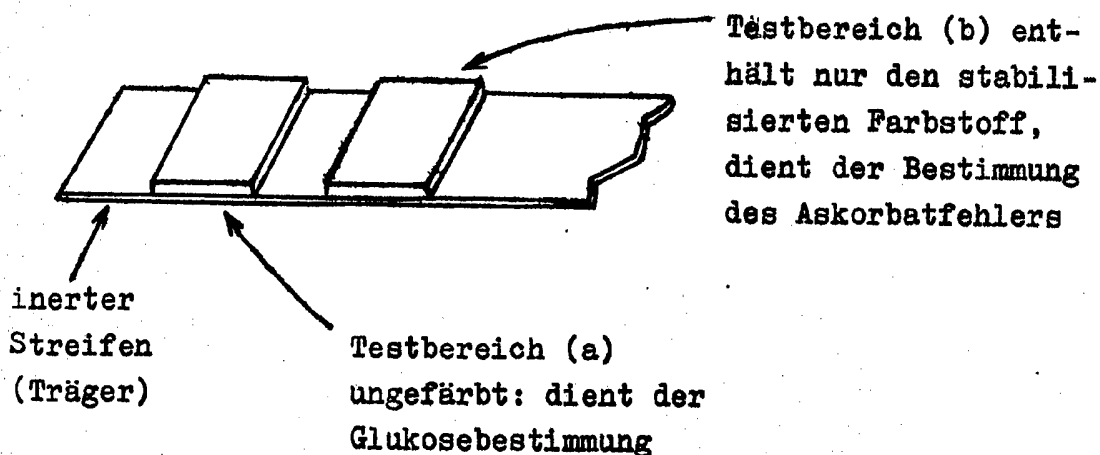


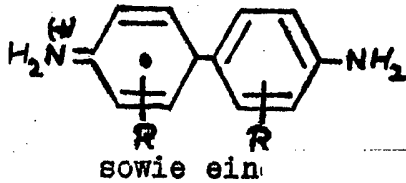
Abb. 1 Prinzip des Teststreifens zur Bestimmung von Glukose unter gleichzeitiger Korrektur des Askorbatfehlers

Testbereich (a) dient der Bestimmung von Glukose, Testbereich (b) der gleichzeitigen Ermittlung des Askorbatfehlers. Die quantitative Auswertung erfolgt für beide Bereiche kolorimetrisch bei gleicher Wellenlänge (bei o-Tolidin z. B. bei 625 nm) unter Verwendung von Eichkurven, die mit Hilfe von Standardlösungen ermittelt werden. Die in der Probe gemessene Glukosekonzentration ist beim Vorhandensein von Askorbat oder anderen reduzierenden Substanzen entsprechend zu korrigieren.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Indikatorsystems, insbesondere in der beschriebenen Ausführung zur gleichzeitigen Bestimmung von Glukose und des Askorbatfehlers besteht in seiner Zuverlässigkeit (anwendbar für quantitative Bestimmungen) und Einfachheit (Auswertung beider Bereiche bei gleicher Wellenlänge).

Erfindungsanspruch

- 1) Indikatorsystem zur quantitativen Bestimmung von Ascorbinsäure neben Glukose in Teststreifen, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Semichinonimin-Farbstoff der allgemeinen Formel I



I, wobei R = H oder ein Alkyl-, Aryl-, Alkoxy- bzw. Phenoxy-Rest

Fixiermittel enthält.

- 2) Anwendung eines Indikatorsystems nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß Farbstoff I und Fixiermittel in einem Bindemittel (z. B. Gelatine) oder einem Vliesmaterial (z. B. Papier) eingebracht und auf eine inerte Unterlage aufgetragen werden.
- 3) Anwendung des Indikatorsystems nach Punkt 1 und 2 zur gleichzeitigen Bestimmung von Glukose und des Ascorbatfehlers, dadurch gekennzeichnet, daß auf einem Teststreifen
- a) das Indikatorsystem nach Punkt 1 zur Bestimmung von Ascorbinsäure und b) das Indikatorsystem nach WP G 01 N/236 500/4 zur Bestimmung von Glukose unmittelbar nebeneinander angeordnet sind und nach Kontakt mit der Probe eine Auswertung über Eichkurven erfolgt.