

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 144949 B



- (21) Ansøgning nr. 2026/77 (51) Int.Cl.³ C 12 Q 1/26
(22) Indleveringsdag 9. maj 1977
(24) Løbedag 9. maj 1977
(41) Alm. tilgængelig 10. dec. 1977
(44) Fremlagt 12. jul. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 9. jun. 1976, 2625834, DE

(71) Ansøger BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, 6800 Mannheim-Waldhof, DE.

(72) Opfinder Josef Danninger, DE: Ulfert Deneke, DE: Gunter Lang, DE: Gerhard Michal, DE: Peter Roeschlau, DE.
(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.

- (54) Fremgangsmåde og reagens til
bestemmelse af substrater
eller enzymaktiviteter.

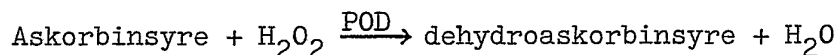
Opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse af substrater eller enzymaktiviteter under anvendelse af en redox-reaktion som målreaktion i nærværelse af askorbinsyre.

I den kliniske og farmaceutiske kemi, biokemien og levnedsmiddelkemien er redox-reaktioner til bestemmelse af enzym- eller substratkoncentrationer af stor interesse. Vurderingen af disse reaktioner kan ske via fotometriske målinger. Såfremt der i testsystemet foruden de redox-komponenter, der er af interesse, findes yderligere reducerende stoffer må man regne med forstyrrelser. I prøvematerialet træffer man særlig hyppigt på askorbinsyre. Som et stærkt reduktionsmiddel giver den anledning til forstyrrelser, når farmaka eller fysiologiske væsker som serum eller urin, askorbinsydeholdige plantesafter eller andre levnedsmidler, som inde-

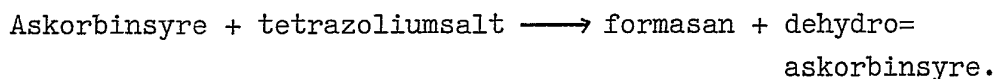
DK 144949 B

holder askorbinsyre, eller hvortil der er sat askorbinsyre, kommer til undersøgelse. Det er således kendt, at følgende reaktioner forstyrres af askorbinsyre:

A. Reaktioner, hvor H_2O_2 og en hydrogendonator omsættes med peroxidase (POD) forstyrres af reaktionen



B. Reaktioner, hvor tetrazoliumsalte bliver reduceret med reduktionsmidler til formasaner forstyrres af reaktionen,



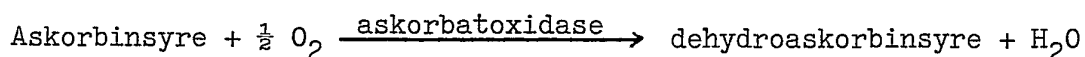
C. Reaktioner, hvor phenoler oxidativt kobles med nucleofile reagenser forstyrres ved, at askorbinsyre på endnu ikke klarlagt måde fører til bireaktioner, således at der opstår inhomogene koblingsprodukter, som med hensyn til absorptionsforhold i normalt og ultraviolet lys afviger fra de på normal måde dannede koblingsprodukter.

Til fjernelse af askorbinsyren fra prøvematerialet er de sædvanlige oxidationsmetoder i reglen uegnede. Oxidationsmidler angriber også substrater og enzymer og nedbryder dem. Deres reduktionsprodukter, for det meste di- eller trivalente metalioner, hæmmer hyppigt enzymerne, som anvendes til indikatorreaktionen. Nedbrydningen af askorbinsyre med oxygen kræver kraftigt alkalisk miljø, f.eks. 25% NaOH. Dette fører ligeledes til nedbrydning af substrater og enzymer.

Formålet med opfindelsen er derfor at tilvejebringe en fremgangsmåde til bestemmelse af substrater eller enzymaktiviteter under anvendelse af en redox-reaktion som målreaktion, og som ikke længere forstyrres af askorbinsyre.

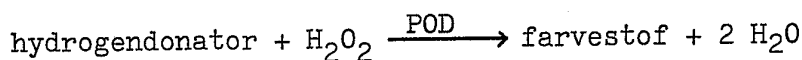
Dette opnås ifølge opfindelsen ved, at askorbatoxidase sættes til reaktionsmassen.

Askorbatoxidase katalyserer reaktionen:



Ifølge oplysningerne i litteraturen vedrørende askorbinsyreoxidase var det forventet, at dette enzym ikke kunne anvendes til opfyldelse af formålet ifølge opfindelsen. Alle hidtil udvundne enzympræparater producerer nemlig H_2O_2 i en bireaktion. Samtidig er askorbat-oxidase genstand for en meget hurtig inaktivering, som tilskrives det samtidigt dannede H_2O_2 (Biochemical Copper Proceedings Symposium Harriman, New York 1965, side 305-337). Dette gælder også for meget rensede præparater som i ultracentrifugen og ved elektroforesen ikke længere viser forureninger (Biochem. 4, 1362 - 1370 (1965)). Reaktionsinaktiveringen føres tilbage til H_2O_2 -dannelsen (Biochem. Biophys. Acta 56, 427 - 439 (1962)). Ifølge de sidste forfatteres beregninger kan 1 U askorbatoxidase i 1 mmol/l askorbinsyreopløsning producere $0,7 \times 10^{-2}$ mmol/l H_2O_2 . Sådanne askorbatkoncentrationer findes hyppigt i prøveopløsninger. Det dannede H_2O_2 er uden videre til rådighed for enzymatiske reaktioner, hvor f.eks. katalase blev påvist.

I systemet



til fotometrisk påvisning af H_2O_2 bevirker det ved en molær ekstinktionskoefficient på ca. $20 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ en ekstinktionsdifferens på 0,14. Da måleområdet for normale fotometriske reaktioner ligger fra ca. 0,01 - 1,00, fremkaldes der her en fejl, som ikke kan accepteres. På samme måde forstyrres reaktioner, hvor der i stedet for H_2O_2 anvendes organiske hydroperoxider og i stedet for POD anvendes hæmoglobin eller andre oxidationskatalysatorer.

Men bortset fra denne af H_2O_2 fremkaldte fejl var det også fra det sidste af de ovennævnte litteratursteder kendt, at omsætningen af askorbinsyre allerede gik i stå lang tid før den fuldstændige fjernelse heraf.

Særligt graverende måtte dette være ved alle sådanne redox-reaktioner, hvor der dannes H_2O_2 , da dette H_2O_2 jo på den ene side måtte accelerere enzyminaktiveringen og på den anden side nydannelsen af H_2O_2 via askorbatoxidase selv fører til fuldstændig uoverskuelige forhold. Det er derfor højst overraskende, at det mod forventningerne er mulig fuldstændigt at fjerne de af tilstedeværende askorbat fremkaldte forstyrrelser ved hjælp af askorbatoxidasetilsæt-

ningen, uden at der optræder andre forstyrrelser, som igen tilintetgør fordelene ved askorbatfjernelsen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes fortrinsvis ved enzymatiske reaktioner, specielt sådanne, hvor der bliver dannet H_2O_2 , altså ved reaktioner, som bliver katalyserede ved hjælp af oxidaser, som glucoseoxidase, urikase, kolesterinoxidase og lignende, desuden ved reaktioner, ved hvilke tetrazoliumsalte bliver reducerede og ved reaktioner, ved hvilke phenoler oxidativt bliver koblet med nucleofile reagenser. Den tilsatte askorbatoxidase mængde retter sig efter størrelsen af askorbinsyremængden, som forventes i prøven. I reglen anvendes 0,002 - 100 U-askorbatoxidase/ml, fortrinsvis 0,01 - 30 U/ml prøvemateriale. Reaktionens pH-værdi retter sig først og fremmest efter den pH-værdi, som kræves for den eller de andre deltagende enzymer. pH-værdier mellem 4,0 og 8,5 viser sig derved som egnede for fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Inden for den foreliggende opfindelses rammer foretrækkes specielt anvendelsen af en askorbatoxidase af Zucchini (*Cucurbita pepo medullosa*). Men også askorbatoxidase af anden oprindelse er egnet.

Opfindelsen angår desuden et reagens til bestemmelse af substrater eller enzymaktiviteter indeholdende et system til bestemmelse af et substrat eller enzym med en redox-reaktion som målereaktion i nærværelse af askorbinsyre, kendetegnet ved, at det indeholder askorbatoxidase.

Foretrukne reagenser af denne art indeholder, såfremt glucose er det substrat, der skal bestemmes, peroxidase, glucoseoxidase, o-dianisidin eller azino-di-3-ethylbenzylthiazolinsulfonat (6) sammen med puffer eller hexokinase, glucose-6-phosphatdehydrogenase, diaphorase, NADP, et tetrazoliumsalt som INT: 3-(4-jodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid og puffer. Ved urinsyre som det substrat, der skal bestemmes, består systemet fortrinsvis af peroxidase, uricase, en phenol, som f.eks. 2,4-dichlorphenol, aminoantipyrin og puffer. I tilfældet med glutamatbestemmelse består systemet fortrinsvis af glutamatdehydrogenase, diaphorase, NAD, INT og puffer. Til tyrosin foretrækkes tyrosinase, 3-methyl-6-kaliumsulfonylbenzthiazolonhydrazon (2), for pyrokatechinbestemmelse diphenoloxidase, 3-methyl-6-kaliumsulfonylbenzthiazolonhydrazon (2), i hvert tilfælde sammen med puffer. Alle disse systemer til bestemmelse af substrater kendes imidlertid. I stedet herfor kan der imidlertid også anvendes andre kendte systemer til bestem-

melse af substrater eller enzymer inden for rammerne af reagenset ifølge opfindelsen.

Af særlig betydning er opfindelsen også til anvendelse på området hurtigdiagnostika. Sådanne hurtigdiagnostika indeholder i reglen de forskellige for fremgangsmådens gennemførelse nødvendige reagenser enten imprægneret i en sugedygtig bærer eller med et egnet bindemiddel anbragt som overtræk på en bærefolie. Den foretrukne udførelsesform er herved tilsætningen af askorbatoxidase til blandingen af de øvrige reagenser med efterfølgende imprægnering på en sugedygtig bærer. På denne måde fås f.eks. af askorbinsyre praktisk taget ikke forstyrret testpapir til påvisning af glucose i urin (f.eks. ifølge DOS 23 38 932) af blod i urin (f.eks. ifølge P 24 60 903-8 eller DBP 22 35 152) og af blod i afføringen. At askorbatoxidasen forbliver funktionsdygtig og lagringsstabil i testpapir for blod i urin må anses for højst overraskende. Disse testpapir indeholder nemlig overskudsmængder af organiske hydroperoxider, af hvilke man, ligesom af H_2O_2 måtte forvente en inaktivering af askorbatoxidasen.

Askorbatoxidasen kan imidlertid også anbringes på en særskilt bærer, som forenes med bæreren for de øvrige reagenser, f.eks. lægges oven på, klæbes sammen med eller pakkes sammen. Som bærer for askorbatoxidase foretrækkes i dette tilfælde specielt et såkaldt vandopløseligt papir (f.eks. ifølge DOS 24 36 598), som lader farvereaktionen fremtræde særligt godt på bærepapiret for de andre reagenser. Denne udførelsesform er særlig fordelagtig, når der i reagenskombinationen findes stoffer, som er uforligelige med askorbatoxidase, f.eks. stærkt sure reagenser som de, der anvendes ved fremgangsmåderne til bestemmelse af urobilinogen, bilirubin og nitrit.

Ved de ovennævnte udførelsesformer anvendes der indtil 5000 U askorbatoxidase pr. ml imprægneringsopløsning, fortrinsvis indtil 2000 U/ml imprægneringsopløsning, til reagensfremstillingen. Mindre end 1 U/ml vil i almindelighed ikke sikre den tilstræbte virkning.

Desuden kan også adskilte bærematerialezoner imprægneres med askorbatoxidase eller de andre testreagenser. I dette tilfælde bringes bæreren hensigtsmæssig således i berøring med opløsningen, der skal undersøges, at opløsningen først kommer i berøring med den askor=

batoxidaseholdige zone, og herfra suges ind i zonen, som indeholder de øvrige testreagenser.

Ifølge en yderligere udførelsesform bindes askorbatoxidasen ifølge de kendte metoder for enzymfiksering på uopløselige bærere til bærematerialet. Egnede metoder kendes fra de tyske offentliggørelses-skrifter 17 68 512, 21 28 743, 22 60 185, 22 60 184, 24 26 988, 26 03 158 og 19 15 970.

Foretrukne metoder for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er glucosebestemmelsen med peroxidase og glucoseoxidase og o-dianisider eller 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat- (6) (ABTS), glucosebestemmelsen ifølge hexokinase/glucose-6-phosphatdehydrogenase-metoden, påvisningen af urinsyre ved hjælp af phenol, aminoantipyrin, peroxidase og uricase, bestemmelsen af thyrosin eller pyrokatechin ved hjælp af SMBTH (4-methyl-6-kaliumsulfonylbenzthiazolonhydrazon (2) og thyrosinase eller diphenoloxidase.

De følgende eksempler belyser opfindelsen yderligere.

Eksempel 1.

Bestemmelse af glucose med o-dianisidin, peroxidase (POD) og glucoseoxidase (GOD), målt i fotometer, bølgelængde 432 nm, måletemperatur: 25°C.

Kuvette nr.	1	2	3	4	5
Phosphatpuffer pH 7,01 M	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
o-dianisidin 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
Glucoseopløsning 1 mg/ml	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Ascorbinsyreop- løsning 10 mM	-	0,1	0,01	0,1	0,01

Kuvette nr.	1	2	3	4	5
Vand	0,12	0,02	0,11	-	0,09
Askorbat-oxidase 500 U/ml	-	-	-	0,02	0,02
inkubation i 1 minut ved 25°C, E ₁ aflæsning, derpå start med					
GOD 70 U/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
inkubation i 30 minutter ved 25°C, E ₂ aflæsning, ΔE beregnet af E ₂ -E ₁					
ΔE	0,541	0,010	0,316	0,540	0,543

Kuvette 1 repræsenterer en uforstyrret måling (ingen askorbinsyre).

Kuvette 2 og 3 viser, at 1 henholdsvis 0,1 μmol askorbat praktisk taget fuldstændig henholdsvis med 41,5% hæmmer testen; kuvette 4 og 5 viser den fuldstændige eliminering af disse askorbatkoncentrationer ved tilsætning af 10 U askorbatoxidase i hvert tilfælde.

Eksempel 2.

Påvisning af glucose med 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)] (ABTS), POD og GOD i fotometer, bølgelængde: 432 nm, måletemperatur: 25°C.

Kuvette nr.	1	2	3	4	5
Phosphatpuffer 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
Glucoseopløsning 0,1 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ascorbinsyreop- løsning 1 mM	-	0,1	0,01	0,1	0,01
Vand	0,12	0,02	0,11	-	0,09
Ascorbatoxidase 500 U/ml	-	-	-	0,02	0,02
inkubation i 1 minut ved 25°C, E ₁ aflæsning, start med					
GOD 70 U/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
inkubation i 30 minutter ved 25°C, E ₂ -aflæsning, beregning af ΔE af E ₂ -E ₁					
ΔE	0,505	0,000	0,40	0,502	0,504

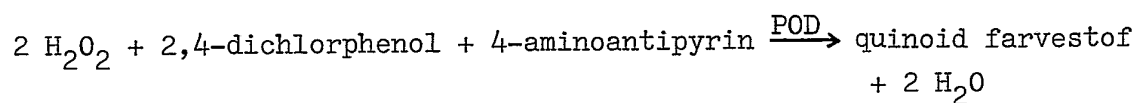
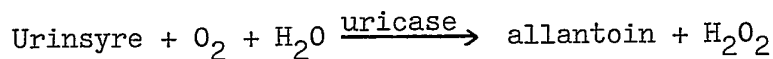
Kuvette 1 svarer til en uforstyrret måling (intet askorbat). Kuvette 2 og 3 viser, at 0,1 henholdsvis 0,01 μmol askorbat fuldstændigt eller med 21% hæmmer testen.

Kuvette 4 og 5 viser den fuldstændige eliminering af disse askorbatkoncentrationer ved hjælp af 10 U askorbatoxidase i hvert tilfælde.

Eksempel 3.

Påvisning af urinsyre ved hjælp af phenol, aminoantipyrin, POD og uricase på analyseautomater (AutoAnalyzer).

Forsøgsprincip



Fremstilling af opløsninger.

1 Askorbatoxidasereagens

I 600 ml bidestilleret vand opløses indholdet af en kolbe 1. Til-sætning af 0,3 ml Brij[®]-35. (Brij[®]-35 = polyethylenglycollauryl-ether). Holdbar i 4 uger i en mørk kolbe ved ca. 4°C og i 1 uge ved ca. 25°C.

2 Uricasereagens

I 800 ml bidestilleret vand opløses indholdet af en kolbe 2. Til-sætning af 2,0 ml Brij[®]-35. (Brij[®]-35 = polyethylenglycollauryl-ether). I mørk kolbe holdbar i 4 uger ved ca. 4°C og i 1 uge ved ca. 25°C.

Koncentrationer af opløsninger.

1 50 mM fosfatpuffer, pH 5,6

askorbatoxidase større end eller lig med i den mængde, som frem-går af tegningens fig. 2.

2 31 mM tris/citronsyre, pH 8,9

uricase større end eller lig med 0,08 U/ml

POD større end eller lig med 0,015 U/ml

3,0 mM 2,4-dichlorphenol, 4,0 mM 4-aminoantipyrin.

Til bestemmelsens gennemførelse sammenstilles automatens slangesys-tem ifølge det i fig. 1 viste skema. Fig. 1 vedrører anvendelsen af analyseautomaten og viser tilførslen af stofferne til automaten.

I fig. 2 findes en grafisk afbildning af forsøgsresultaterne.

Eksempel 4.

Påvisning af glucose med HK/G6P-DH, NADP, INT og diaforase i foto-meteret. Målebølgelængde: 492 nm, inkubationstemperatur: 25°C.

Kuvette nr.	1	2	3
Phosphatpuffer, pH 7,5 0,1 M	1,7	1,7	1,7
NADP/INT pr. 1 mg/ml	0,1	0,1	0,1
Diaforase 5 U/ml	0,1	0,1	0,1
Glucoseopløsning 0,05 mg/ml	0,1	0,1	0,1
Askorbatoopløsning 10 mM	-	0,01	0,01
Askorbat-oxidase 35 U/ml	-	-	0,03
Vand	0,04	0,03	-
inkubation i 3 minutter ved 25°C, E ₁ -aflysning, start med			
HK/G6P-DH-opløsning pr. 56 U/ml	0,05	0,05	0,05
inkubation i 15 minutter, E ₂ -aflysning, beregning af ΔE af E ₂ -E ₁			
ΔE	0,234	0,307	0,230

Kuvette 1 svarer til en uforstyrret måling.

Kuvette 2 viser, at 0,01 μmol askorbat lader testen forløbe omkring 34% for højt, kuvette 3 viser, at 1 U askorbatoxidase fuldstændig eliminerer denne forstyrrelse.

Eksempel 5.

Bestemmelse af glutamat ved hjælp af GLDH, NAD/INT/diaforase i fotometeret. Målebølgelængde 492 nm, temperatur 25°C.

Kuvette nr.	1	2	3	4	5
Phosphatpuffer pH 5,6, 0,01 mM	1,30	1,20	1,29	1,18	1,27
Glutamatopløsning 0,2 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Askorbatoopløsning 5 mM	-	0,1	0,01	0,1	0,01
Askorbat-oxidase 100 U/ml	-	-	-	0,02	0,02
inkubation i 3 minutter ved 25°C, derpå pipettering i de enkelte kuvetter					

Kuvette nr.	1	2	3	4	5
0,2 M triethanolamin, 0,05 M kaliumphosphatpuffer, pH 8,6 med 1,5% "Triton [®] -X-100" (=alkylaryl-polyethylen-glycolether)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
NAD-opløsning, 5 mg/ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Diaforaseopløsning 10 U/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GLDH 1000 U/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
E ₁ - aflæsning, reaktion start med					
INT-opløsning, 2 mg/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
inkubation i 15 minutter ved 25°C, E ₂ - aflæsning, beregning af ΔE af E ₂ -E ₁					
ΔE	0,184	1,560	0,380	0,186	0,182

Kuvette 1 svarer til en uforstyrret måling.
 Kuvette 2 og 3 viser, at 0,5 henholdsvis 0,05 μmol askorbat lader testen udvise omkring 700% henholdsvis omkring 100% for højt.
 Kuvette 4 og 5 viser den fuldstændige eliminering af denne forstyrrelse ved hjælp af 2 U askorbat-oxidase.

Eksempel 6.

Bestemmelse af tyrosin med 3-methyl-6-kaliumsulfonyl-benzthiazolon-hydrason-(2) (SMBTH) og tyrosinase i fotometeret, målebølgelængde 492 nm, måletemperatur 25°C.

Kuvette nr.	1	2	3
Phosphatpuffer, pH 5,2, 0,25 M	2,77	2,77	2,77
SMBTH 0,1 M	0,05	0,05	0,05
Askorbinsyreopløsning 10 mM	-	0,1	0,1
Vand	0,12	0,02	-
Askorbat-oxidase 500 U/ml	-	-	0,02
Tyrosinase 60 U/ml	0,05	0,05	0,05
inkubation i 1 minut ved 25°C, E ₁ - aflæsning, start med			

Kuvette nr.	1	2	3
Tyrosin 2 mM	0,05	0,05	0,05
inkubation i 1 time ved 25°C, E ₂ - aflæsning, beregning af ΔE af E ₂ -E ₁			
ΔE	1,113	0,728	1,100

Kuvette 1 svarer til en uforstyrret måling. I kuvette 2 sænker 1 μmol askorbat den teoretiske værdi omkring 35%, i kuvette 3 er denne påvirkning fuldstændig elimineret ved hjælp af 10 U askorbat-oxidase.

Eksempel 7.

Bestemmelse af pyrokatechin med SMBTH og diphenol-oxidase

Kuvette nr.	1	2	3
Phosphatpuffer, 0,25 M pH 5,2	2,80	2,70	2,68
SMBTH 0,1	0,05	0,05	0,05
pyrokatechin 0,5 M	0,10	0,10	0,10
Askorbatopløsning 20 mM	-	0,1	0,1
Askorbat-oxidase 500 U/ml	-	-	0,02
Inkubation i 1 minut ved 25°C, E ₁ - aflæsning, start med			
Diphenol-oxidase 200 U/ml	0,05	0,05	0,05
Inkubation i 17 minutter ved 25°C, E ₂ - aflæsning, beregning af ΔE af E ₂ -E ₁			
ΔE	0,890	0,485	0,896

Kuvette 1 svarer til en uforstyrret måling. I kuvette 2 sænker 2 μmol askorbat den teoretiske værdi omkring 47%, denne indvirkning er fuldstændigt elimineret i kuvette 3 ved hjælp af 10 U askorbat-oxidase.

Eksempel 8.

Testpapir til påvisning af glucose i urin.

Filtrerpapir gennemvædes med en opløsning af følgende sammensætning og tørres ved 50°C:

1,2 m citratpuffer pH 5	50,0 ml
9-(γ -dimethylaminopropyl)-6-chlor-3-amino-carbazol-dihydrochlorid	0,75 g
Glucoseoxidase (104 U/mg)	0,25 g
Peroxidase (63 U/mg)	0,05 g
Askorbatoxidase (100 U/mg)	1,00 g
Vand	100,0 ml.

Testpapiret reagerer med glucoseholdig urin med rødorange til sort-røde farvetoner. Efter en reaktionstid på 2 minutter giver urin med ens glucoseindhold med askorbinsyreindhold på indtil 150 mg/dl praktisk taget ens reaktionsfarver.

Med testpapir af analog sammensætning, men uden askorbatoxidase, er reaktionsfarverne, alt efter glucoseindhold, ved askorbinsyre-koncentrationer fra 50 mg/dl afsvækket eller fuldstændig undertrykt.

Eksempel 9.

Testpapir til påvisning af blod i urin.

Filterpapir imprægneres efter hinanden med følgende opløsninger og tørres ved 40°C.

Opløsning 1

1,2 m citratpuffer pH 5,25	35,0 ml
Ethylendiamintetraeddikesyre, dinatriumsalt	0,1 g
Diocetylnatriumsulfosuccinat	0,5 g
2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid (ca. 70%ig)	1,6 g
Phosphorsyretrimorpholid	12,7 g
Askorbatoxidase (100 U/mg)	0,3 g
Methanol	30,0 ml
Vand	til 100,0 ml

Opløsning 2

3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin	0,3 g
Phenanthridin	0,2 g
Toluen/petroleumsether (30:70)	til 100,0 ml

Med dette testpapir kan nærværelsen af 5 erythrocyter/mm³ i urin-stof også påvises i nærværelse af 30 - 50 mg askorbinsyre/100 ml. Med et testpapir af samme sammensætning, men uden askorbatoxidase mislykkedes denne påvisning allerede i nærværelse af fra 10 - 20 mg askorbinsyre/100 ml.

Eksempel 10.Testpapir A

Testpapir som i eksempel 9 uden askorbatoxidase.

Testpapir B

Vandopløseligt papir af carboxymethylcellulose (fladevægt 60 g/m²) gennemvædes med en opløsning af 20% iseddike i methanol til neutralisation og tørres. Derpå sprøjtes med en vandig opløsning af askorbatoxidase (10³ U/ml) og tørres straks.

Testpapir B anbringes på testpapir A, og begge fastholdes sammen mellem en polyesterfolie og et nylonnet. Urinet, der skal undersøges, dryppes på de således fremstillede prøvestrimler.

Der blev opnået tilsvarende resultater som angivet i eksempel 9.

Eksempel 11.Testpapir til påvisning af blod i afføring.

Filterpapir imprægneres efter hinanden med følgende opløsninger og tørres ved 40°C.

Opløsning 1

1,2 m citratpuffer, pH 5,25	10 ml
Askorbatoxidase 100 U/mg	0,3 g
Vand	til 100,0 ml

Opløsning 2

Guajakharpiks	3 g
Toluen	til 100,0 ml

Opløsningen filtreres, og kun filtratet anvendes til imprægneringen.

Der fås et testpapir, som bestryges med afføring. Såfremt der på bagsiden dryppes en 3%ig vandig opløsning af hydrogenperoxid, fås en blåfarvning, når afføringen indeholder ca. 2% blod. Denne farvning optræder også ved askorbinsyreholdig afføring (ca. 15 mg/100 g), medens den i dette tilfælde udebliver ved et testpapir uden askorbatoxidase.

Eksempel 12Måling af enzymaktivitet ved hjælp af askorbat-oxidase (AAO)

Påvisning af POD ved hjælp af ABTS i fotometer, bølgelængde 432 nm, måletemperatur 25°C.

	Kuvette nr.				
	1	2	3	4	5
Phosphat-puffer 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
Ascorbat 1 mmol/l	-	0,1	0,01	0,1	0,01
H ₂ O	0,12	0,02	0,11	-	0,09
AAO 500 U/ml	-	-	-	0,02	0,02
Inkubation ved 1 min. ved 25°C, starter derpå med					
H ₂ O ₂ 10 mmol/l	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Δ E/min. bestemmes derpå.					

Kuvette 1 viser en uforstyrret måling, som straks efter starten viser en Δ E/min. på ca. 0,052. I kuvette 2 forstyrrer askorbat således, at der i løbet af 30 min. overhovedet ikke vises noget signal. Den ringere askorbatmængde i kuvette 3 undertrykker i 2 min. fuldstændigt reaktionen, som yderligere i 2 min. viser en fast fase før opnåelse af maksimal reaktionshastighed. I kuvette 4 og i kuvette 5 fjernes disse forstyrrelser fuldstændigt ved til-sætning af AAO.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af substrater eller enzymakti-
teter under anvendelse af en redox-reaktion som målreaktion i nær-
værelse af askorbinsyre, k e n d e t e g n e t ved, at der arbej-
des i nærværelse af askorbatoxidase.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der
anvendes 0,002-100 U askorbatoxidase/ml testpræparat.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2, k e n d e t e g n e t ved,
at den gennemføres ved pH-værdier mellem 4,0 og 8,5.

4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en askorbatoxidase af Zucchini (Cucurbita pepo medullosa).

5. Reagens til udøvelse af fremgangsmåden ifølge krav 1, indeholdende et system til bestemmelse af et substrat eller enzym med en redox-reaktion som målereaktion i nærværelse af askorbinsyre, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder askorbatoxidase.

6. Reagens ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at askorbat-oxidasen foreligger imprægneret på et vandopløseligt bladformet bæremateriale, systemet til bestemmelse af et substrat foreligger imprægneret på et i vand uopløseligt bladformet sugedygtigt bæremateriale, og at det vandopløselige og det i vand ikke opløselige bæremateriale er kombineret til et laminat.

7. Reagens ifølge krav 5 til påvisning af blod i afføring, k e n d e t e g n e t ved, at det består af med askorbatoxidase, guajak-harpiks og puffer imprægneret papir samt adskilt herfra en hydrogenperoxidopløsning.

Fremdragne publikationer:

Fig.1

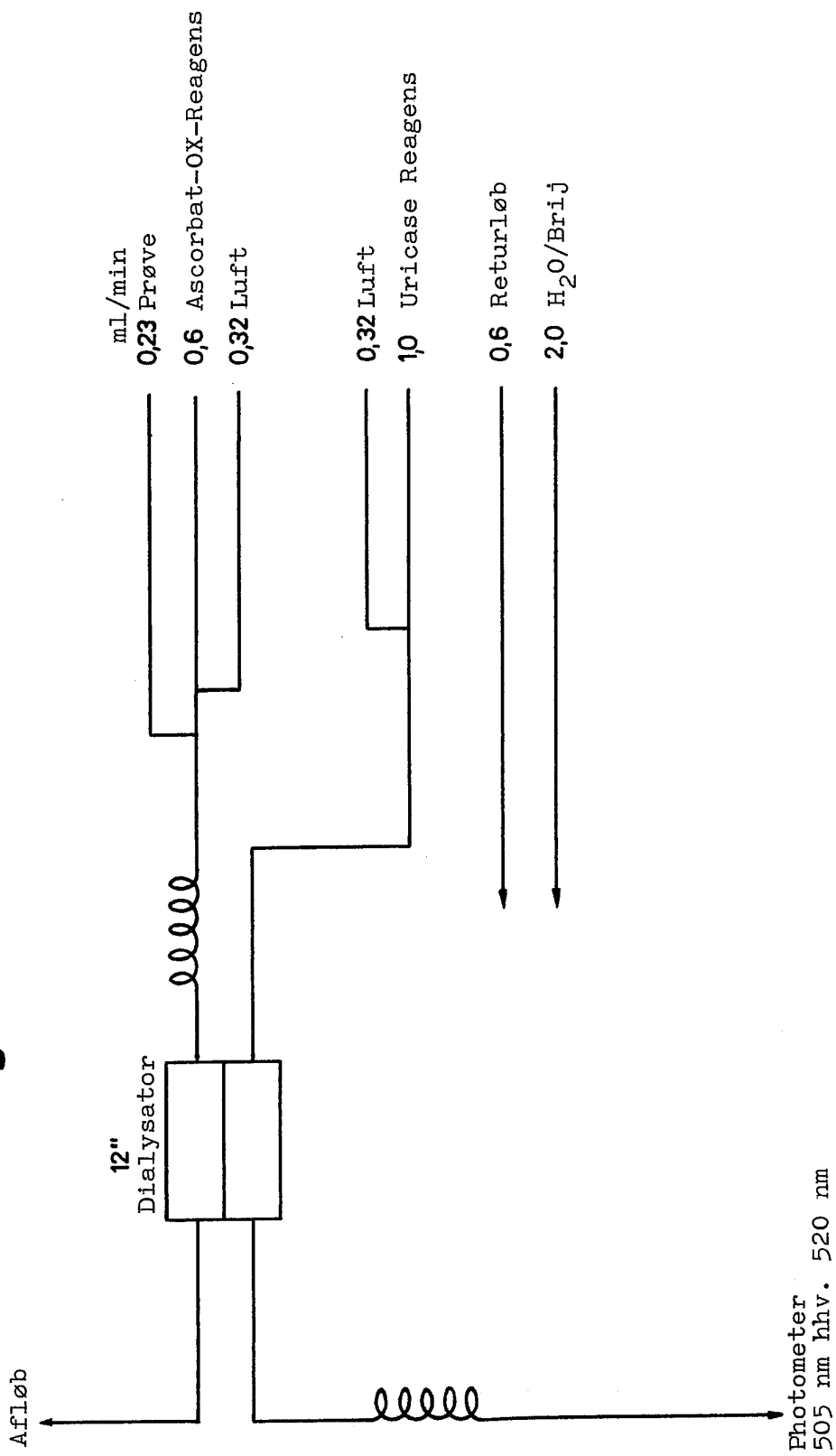
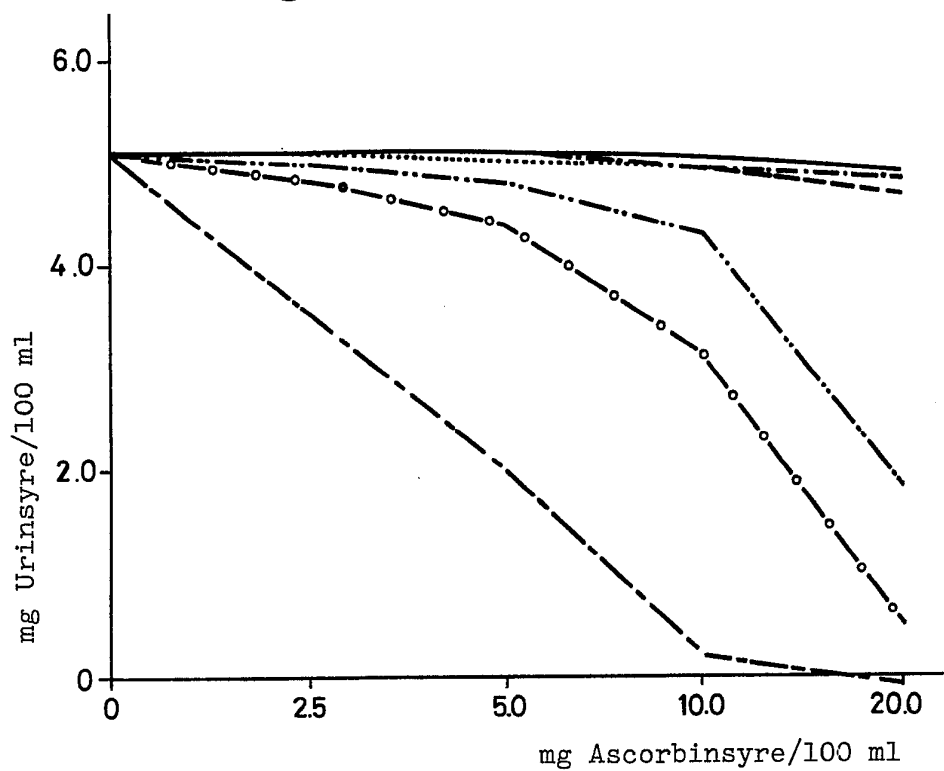


Fig. 2



— 0,9 U/ml Ascorbat-Oxidase
 - - - 0,67 U/ml "
 0,45 U/ml "
 - · - · 0,225 U/ml "
 - - - - 0,112 U/ml "
 - o - o 0,056 U/ml "
 - · - · - Puffer uden Ascorbat-Oxidase