



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 669 673 A5

⑤① Int. Cl.⁴: G 01 N 33/50

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 1983/85

㉔ Anmeldungsdatum: 08.05.1985

㉔ Patent erteilt: 31.03.1989

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.03.1989

㉗ Inhaber:
Reanal Finomvegyszergyar, Budapest (HU)

㉗ Erfinder:
Farago, Ferenc, Dr., Kecskemét (HU)
Jancso, Tamas, Dr., Kecskemét (HU)
Daroczi, Ivan, Budapest (HU)
Zajka, Gabriella, Dr., Budapest (HU)

㉗ Vertreter:
Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich

⑤④ **Reagens zur Bestimmung von Glukose, Cholesterin, Harnsäure und Haemoglobin.**

⑤⑦ Das Reagens zur Bestimmung von Glukose, Cholesterin, Harnsäure und Hämoglobin, vorteilhaft in biologischen Proben, enthält Thymol, 4-Amino-phenanzon, eine Pufferlösung, ein Stabilisierungsmittel, für die Bestimmung von Cholesterin ein Detergens und gegebenenfalls einen Enzymkatalysator.

Mit diesem Reagens findet eine sehr gute Empfindlichkeit aufweisende photometrische Reaktion statt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Reagens zur Bestimmung von Glukose, Cholesterin, Harnsäure und Hämoglobin, insbesondere in biologischen Proben, welches 4-Amino-phenazon, eine Pufferlösung, ein Stabilisierungsmittel und für die Bestimmung von Cholesterin ein Detergens enthält, dadurch gekennzeichnet, dass es als Reagens Thymol enthält.

2. Reagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Enzymkatalysator enthält.

3. Reagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es das Thymol in einem niederen Alkanol, vorteilhaft Äthanol, gelöst, in einer Konzentration von 2,30 bis 2,70 mMol/l, vorzugsweise 2,5 mMol/l, enthält.

4. Reagens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es

0,6 bis 1,0 mMol/l, vorteilhaft 0,8 mMol/l, 4-Amino-phenazon,

0,06 bis 0,1 Mol/l einer Pufferlösung, vorteilhaft 0,08 Mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$,

9,75 bis 9,95 mMol/l, vorteilhaft 9,85 mMol/l, Natriumazid als Stabilisator,

310 bis 350 mMol/l, vorteilhaft 330 mMol/l, Äthanol,

0,2 bis 1,0%, vorteilhaft 0,4%, Detergens des Polyoxyäthyläther-Typs,

8 bis 12 E/ml, vorteilhaft 10 E/ml, Glukoseoxydase und 13 bis 17 E/ml, vorteilhaft 15 E/ml, Peroxydase, oder

8 bis 12 E/ml, vorteilhaft 10 E/ml, Cholesterinesterase und 4 bis 6 E/ml, vorteilhaft 5 E/ml, Cholesterinoxidase und

13 bis 17 E/ml, vorteilhaft 15 E/ml, Peroxydase, oder

4 bis 6 E/ml, vorteilhaft 5 E/ml, Urikase und

13 bis 17 E/ml, vorteilhaft 15 E/ml, Peroxydase enthält.

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein neues Reagens zur Bestimmung von Glukose, Cholesterin, Harnsäure und Hämoglobin, insbesondere in biologischen Proben.

Zum Nachweis und quantitativer Bestimmung von Glukose, Cholesterin, Harnsäure und Hämoglobin sind mehrere Verfahren bekannt. Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit und Billigkeit sowie aus messtechnischen Gründen finden am verbreitetsten die auf einer chemischen Farbreaktion beruhenden Methoden Anwendung.

Zur Messung der obigen Substanzen wird im allgemeinen die Farbreaktion mit 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-amino-pyrazolin-5-on (weiterhin: 4-Amino-phenazon genannt), Phenol, Phenolderivaten und Salizylsäurederivaten verwendet. Die mit Phenol-4-amino-phenazon stattfindende Reaktion wurde durch P. Trinder [Ann. Clin. Biochem, 6, 24 (1969)] zum ersten Mal zur Bestimmung des Blutzuckers verwendet. Die ärztliche Wichtigkeit dieser Methodik ist so gross, dass zu diesem Zweck zahllose ähnliche Methoden ausgearbeitet wurden.

Der allgemeine Nachteil dieser Methoden besteht darin, dass die Messcharakteristik nicht linear ist und die entstandene Farbe nicht genügend stabil bzw. lichtempfindlich ist (s. Tabelle 1 des zitierten Artikels und Tabelle 3 der vorliegenden Patentschrift).

Das Ziel der Erfindung ist die Ausarbeitung eines neuen, die Nachteile der bekannten Methoden behebenden Systems.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass falls man zur Bildung des farbigen Produktes 4-Amino-phenazon und Thymol verwendet, unter optimalen Bedingungen eine ausgezeichnete, sehr gut verwendbare (stabile, nicht lichtempfindliche, lineare Charakteristik) und eine sehr gute Empfindlichkeit aufweisende photometrische Reaktion stattfindet.

Die Erfindung betrifft ein Reagens zur Bestimmung von Glukose, Cholesterin, Harnsäure und Hämoglobin, insbesondere in biologischen Proben, welches 4-Amino-phenazon, eine Pufferlösung, ein Stabilisierungsmittel für die Bestimmung von Cholesterin, ein Detergens und gegebenenfalls einen Enzymkatalysator enthält, dadurch gekennzeichnet, dass es als Reagens Thymol (para-Isopropyl-meta-kresol) enthält.

Nach einer vorteilhaften Ausführungsform der erfindungsgemässen Reagentien wird Thymol in einem niederen Alkohol, vorzugsweise Äthanol, gelöst; die anderen chemischen Substanzen werden in destilliertem Wasser gelöst und die alkoholischen und wässrigen Lösungen werden miteinander in einem Verhältnis von 1:4 vermischt. Das so hergestellte Reagens enthält das Thymol in einer Konzentration von $2,5 \pm 0,2$ mMol/l.

Die Konzentration der weiteren chemischen Substanzen ist im Reagens wie folgt:

Phosphatpuffer	0,08 \pm 0,02 mMol/l
4-Amino-phenazon	0,8 \pm 0,2 mMol/l
Natriumazid	9,85 \pm 0,1 mMol/l
Äthanol	330,0 \pm 20 mMol/l

Das erfindungsgemässe Reagens wird folgendermassen verwendet: das Thymol und 4-Amino-phenazon werden mit den zu bestimmenden Substanzen (Glukose, Cholesterin, Harnsäure) in geeigneten Konzentrationen in einem gepufferten Medium in Berührung gebracht. Damit wird durch spezifische enzymatische Reaktionen Wasserstoffperoxyd gebildet. Aus dem entstandenen Wasserstoffperoxyd wird mit Hilfe von Peroxydase nascierender Sauerstoff freigesetzt, welcher das 4-(2'-Isopropyl-5'-methyl-1',4'-benzochinon-mono-imino)-phenazon (d.h. das farbige Produkt) zustandebringt. Im Falle von Substanzen, welche zur Katalysierung der Zersetzung des Wasserstoffperoxyds an sich fähig sind (z.B. Hämoglobin), ist keine ergänzende enzymatische Reaktion notwendig, und dem Reaktionsgemisch wird nur Wasserstoffperoxyd, das farbbildende 4-Amino-phenazon und das Thymol zugesetzt.

Das erfindungsgemässe neue Reagens besitzt mehrere Vorteile, welche wie folgt zusammengefasst werden können:

a) Die Farbreaktion findet in einem gut-definierten pH-Bereich statt ($\text{Ph} = 7,0\text{-}8,0$ — vorzugsweise 7,5).

b) Das Maximum der Lichtabsorption des gebildeten farbigen Produktes fällt in den Wellenlängenbereich von 465-480 nm; es ist deshalb zweckmässig, die photometrischen Messungen in diesem Bereich — insbesondere bei 475 nm — durchzuführen.

c) Es ist von besonderer Wichtigkeit, dass die photometrisch nachweisbare Farbe verhältnismässig rasch gebildet wird. Es wurde festgestellt, dass die stabile Farbe bei Raumtemperatur innerhalb von 25 Minuten und bei 37°C binnen 15 Minuten entsteht.

d) Zur Einstellung des optimalen pH-Wertes kommen verschiedene Puffer in Betracht (wie tris-Phosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ und Natriumborat-Salzsäure).

e) Es ist gelungen, die günstige Thymolkonzentration bzw. das Lösungsmittel davon zu bestimmen. Es ist zweckmässig das Thymol in Methanol, Äthanol oder Isopropanol — insbesondere Äthanol — aufzulösen. Die Optimalisierung der Thymolkonzentration wird in der Tabelle 1 angegeben; der optimale Wert beträgt 2,5 mMol/l. Die Messungen werden mit einer Glukose-lösung der angegebenen Konzentration (11,10 und 27,75 mMol/l) durchgeführt.

TABELLE 1

Thymol mMol/l	1,330	2,000	2,500	3,000	4,000	5,000
Extinktion 11,1 mMol/l	0,330	0,365	0,370	0,370	0,370	0,370
Extinktion 27,75 mMol/l	0,750	0,860	0,870	0,870	0,870	0,870

Es ist ersichtlich, dass im Falle der beiden Glukoselösungen die höchste, nicht mehr steigende Extinktion (Farbenintensität) bei einer Thymolkonzentration von 2,5 mMol/l erhalten wird.

f) Die Optimalisierung der Konzentration des 4-Amino-phenazons wird in der Tabelle 2 angegeben. Die Messungen werden auch in diesem Falle mit einer Glukoselösung und einer Thymollösung der Konzentration von 2,5 mMol/l durchgeführt.

TABELLE 2

4-Amino- phenazon mMol/l	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000
Extinktion 11,1 mMol/l	0,350	0,370	0,370	0,370	0,370
Extinktion 27,75 mMol/l	0,800	0,860	0,870	0,870	0,871

Nach dieser Tabelle wird die maximale, sich nicht mehr ändernde Extinktion bei einer Konzentration von 0,600 mMol/l erhalten. Der Sicherheit halber wird die Konzentration von 0,800 mMol/l als optimal betrachtet.

g) Die zur Messung der Glukose, des Cholesterins und der Harnsäure erforderliche Peroxydkonzentration wird ebenfalls optimiert (siehe Tabelle 3). Als optimale Konzentration hat sich die Konzentration von 15 E/ml erwiesen. (1 E = 1 interna-

tionale Einheit; die Menge, welche 1 mMol Substrat innerhalb von 1 Minute ersetzt.) Die verwendete Peroxydase darf andere Enzymverunreinigungen in störenden Konzentrationen nicht enthalten.

TABELLE 3

Peroxydase- aktivität	8	10	12	14	15	17
E/ml	E/ml	E/ml	E/ml	E/ml	E/ml	E/ml
Extinktion 27,75 mMol/l	0,820	0,850	0,865	0,870	0,870	0,870

Es ist aus der obigen Tabelle ersichtlich, dass die maximale Intensität (Extinktion) der mit Glukose gebildeten Farbe bereits bei einer Enzymaktivität von 14 E/ml erreicht wird; der Sicherheit halber wird eine Aktivität von 15 E/ml verwendet.

h) Bei der Cholesterinbestimmung wird ein Detergens eingesetzt um die Lösbarkeit zu erhöhen. Zu diesem Zweck kann 9-Lauryläther-polydekanol (Sigma, USA), Triton X-100 (Oktylphenolpolyäthylenglykoläther, LOBA, Österreich) oder Brij 35 (Polyoxyäthylenlauryläther, BDH, England) verwendet werden.

Der optimale Konzentrationsbereich der obigen Mittel beträgt 0,4-1,2%.

Die praktische Anwendbarkeit der erfindungsgemässen Reagenzien wird durch die nachstehenden Verfahren veranschaulicht.

30 1. Mit den Kalibrationen erhaltene Erfahrungen

Die Nachweisbarkeit und quantitative Messbarkeit der Glukose wird in einem Konzentrationsbereich von 2,775-33,300 mMol/l bestimmt. Die Angaben werden teilweise in der Tabelle 4 und teilweise auf der Abbildung 1 zusammengefasst (nach mathematischer Auswertung). Es ist aus den obigen Angaben ersichtlich, dass die Messcharakteristik — im gegebenen Bereich — linear ist. Die Farbenreaktion verläuft vollständig und die Glukose ist ausgezeichnet messbar.

TABELLE 4

x mMol/l	2,775	5,550	8,325	11,100	13,875	16,650	22,200	27,750	33,300
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
\bar{y}	0,0950	0,1833	0,2783	0,3683	0,4616	0,5500	0,7300	0,9133	1,1210
Y	0,0951	0,1860	0,2769	0,3679	0,4588	0,5497	0,7316	0,9135	1,0953
d%	-0,10	-1,45	+0,50	+0,10	+0,61	+0,05	-0,22	-0,02	+2,32
$F_R = 246\ 895;$	$F_L = 1,20746;$		(F.G.: 6; 16)		P 0,10				

In der Tabelle 4 werden die folgenden Abkürzungen verwen-

55 det:

x = Konzentration der eingewogenen Glukose;

n = Zahl der parallelen Messungen;

\bar{y} = durchschnittlicher Wert der gemessenen Extinktionen;
Y = aus der Gleichung der Kalibrationsgerade berechneten Extinktionen;

60 d% = der prozentuelle Unterschied zwischen den gemessenen und berechneten Extinktionen (berechnet = 100%);

F_R = Probe der Regression;

F_L = «F» Probe der Linearität;

65 F.G. = Freiheitsgrad der Linearität;

P = Wahrscheinlichkeit der Linearität; da dieser Wert grösser als 10% ist, weicht die Kurve von der Gerade nicht signifikant ab.

2. Die mit dem Vergleich zur Referenzmethode erhaltenen Erfahrungen

Als Referenzmethode dient der international anerkannte Boehringer Hexokinase UV-Test. Als zuckerhaltige Lösung werden in diesem Falle 45 menschliche Blutproben (ohne Wahl) eingesetzt. Es ist aus der Abbildung 2 ersichtlich, dass es zwischen den nach diesen zwei Methoden erhaltenen Ergebnissen keinen Unterschied gibt, da der Korrelationskoeffizient ($r = +0,9971$) dem theoretischen Wert von 1,000 ganz nahe kommt und die Steilheit der Regressionsgerade von dem theoretischen Wert von 1,000 nur um 0,4% abweicht.

3. Die Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Verzerrung des Verfahrens werden aufgrund der erhaltenen Messergebnisse bestimmt. Diese statistischen Kalkulationen ergeben die folgenden Ergebnisse:

Empfindlichkeit: $\pm 0,17$ mMol/l (auf Glukose bezogen)
Genauigkeit: $\pm 0,09$ mMol/l (auf Glukose bezogen)
Verzerrung: $\pm 0,35\%$ (auf Glukose bezogen).

Das erfindungsgemässe Reagens verfügt ausser den Obenangeführten auch über weitere wesentliche Vorteile: das Reagens ist einerseits zur quantitativen Bestimmung von in biologischen Proben menschlichen und tierischen Ursprungs (z.B. Blut, Urin, Liquor) vorkommenden Glukose, Cholesterin, Harnsäure bzw. Hämoglobin (roter Blutfarbstoff) und andererseits zur Bestimmung des Glukosegehaltes in Getränken zum menschlichen Verzehr (z.B. alkoholische Getränke, Säfte, erfrischende Getränke) bzw. zur Messung von anderen, glukose-, cholesterin- oder harnsäurehaltigen Lösungen geeignet.

Es soll betont werden, dass das erfindungsgemässe Reagens den bekannten Testen klar überlegen ist. Es geht aus einem zahlenmässigen Vergleich hervor, dass nach der erfindungsgemässen Testmethode die Farbe mindestens 240 Minuten lang vollständig unverändert bleibt, dagegen wird nach den bekannten Methoden nach einer kurzen Maximumphase (nach 45 Minuten) eine kontinuierlich abnehmende Farbenintensität beobachtet (Abbildung 3).

Das erfindungsgemässe Reagens und die Anwendung davon werden in den nachstehenden Beispielen illustriert, ohne den Schutzzumfang auf diese Beispiele einzuschränken.

Beispiel 1

Bestimmung von Glukose im Blutserum

A-Lösung: In 0,1 Mol/l einer Phosphatpuffer-Lösung /pH = 7,5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4) werden die folgenden Substanzen aufgelöst:

Glukosidase:	12,5 E/ml
Peroxydase:	18 E/ml
4-Amino-phenazon:	1,0 mMol/l
Natriumazid	12,3 mMol/l

B-Lösung: 12,5 mMol/l Thymol in 96%igem Äthanol (mit destilliertem Wasser).

Das Reagens wird so hergestellt, dass man die A- und B-Lösung in einem Verhältnis von 4:1 miteinander vermischt.

Die Standardisierung wird mit einer 11,1 mMol/l Glukose-lösung (in kalt gesättigter Benzoesäure gelöst) durchgeführt.

Bestimmung: In Probierröhrchen werden je 3,0 ml Reagens, 0,02 ml Standard bzw. in weitere Probierröhrchen 0,02 ml Blutserum eingewogen.

Die Substanzen werden vermischt und stehengelassen (bei Raumtemperatur 30 Minuten lang oder bei 37°C 15 Minuten lang). Im letzteren Falle wird die nach 10minütiger Kühlung gebildete Farbe mit einer Blindprobe photometrisch verglichen (Küvettdicke 1 cm; Wellenlänge 475 nm).

Die Blutserumkonzentration (in Glukose mMol/l) wird nach der nachstehenden Gleichung berechnet.:

$$\frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{standarde Extinktion}} \times 11,1$$

Das Verfahren ist im Bereich von 0-30 mMol/l linear.

Beispiel 2

Bestimmung des Gesamtcholesteringehaltes im Blutserum

A-Lösung: In einem Phosphatpuffer (0,1 Mol/l; pH 7,5) werden die folgenden Substanzen aufgelöst:

Peroxydase	18 E/ml
Cholesterinesterase	12,5 E/ml
Cholesterinoxydase	6 E/ml
4-Amino-phenazon	1,0 mMol/l
Natriumazid	12,3 mMol/l
9-Lauryläther	5,0 g/l oder
Triton X-100	5 g/l oder
Brij-35	5 gl

B-Lösung: 12,5 mMol/l (in 96%igem frischdestilliertem Äthanol).

Das Reagens wird so hergestellt, dass man die A- und B-Lösung vor Gebrauch miteinander in einem Verhältnis von 4:1 vermischt.

Die Standardisierung wird mit einem in Äthanol gelösten Cholesterinstandard (5,2 mMol/l) durchgeführt.

Bestimmung: Zu je 2,0 ml Reagens werden 0,02 ml Standardlösung bzw. Serum zugefügt. Das Gemisch wird gerührt und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang oder bei 37°C 15 Minuten lang stehengelassen. Die nach 10minütiger Abkühlung entstandene Farbe wird photometrisch mit dem Blindversuch verglichen (Küvettdicke 1 cm; Wellenlänge 475 nm).

Berechnung: Blutserumcholesterinkonzentration (mMol/l) =

$$\frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{standarde Extinktion}} \times 5,2$$

Das Verfahren ist im Bereich von 0-13 mMol/l linear.

Beispiel 3

Bestimmung von Harnsäure im Blutserum

A-Lösung: In einem Phosphatpuffer (0,1 Mol/l; pH 7,5) werden die folgenden Substanzen aufgelöst:

Peroxydase	18 E/ml
Urikase	6 E/ml
4-Amino-phenazon	1,0 mMol/l
Natriumazid	12,2 mMol/l

B-Lösung: 12,5 mMol/l Thymol (in 96%igem Äthanol).

Das Reagens wird so hergestellt, dass man die Lösungen A und B miteinander in einem Verhältnis von 4:1 vermischt.

Die Standardisierung wird mit einem Harnsäurestandard (595 $\mu\text{Mol/l}$) durchgeführt.

Bestimmung: Zu je 0,2 ml Reagens werden 0,2 ml Standard bzw. Serumprobe zugefügt. Das Gemisch wird vermischt und entweder 60 Minuten lang bei Raumtemperatur oder 30 Minuten lang bei 37°C stehengelassen. Die entstandene Farbe mit dem Blindversuch photometrisch verglichen (Küvettdicke 1 cm; Wellenlänge 475 nm).

Berechnung: Harnsäurekonzentration des Blutserums ($\mu\text{Mol/l}$) =

$$\frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{standarde Extinktion}} \times 595$$

Das Verfahren ist im Bereich von 0-900 $\mu\text{Mol/l}$ linear.

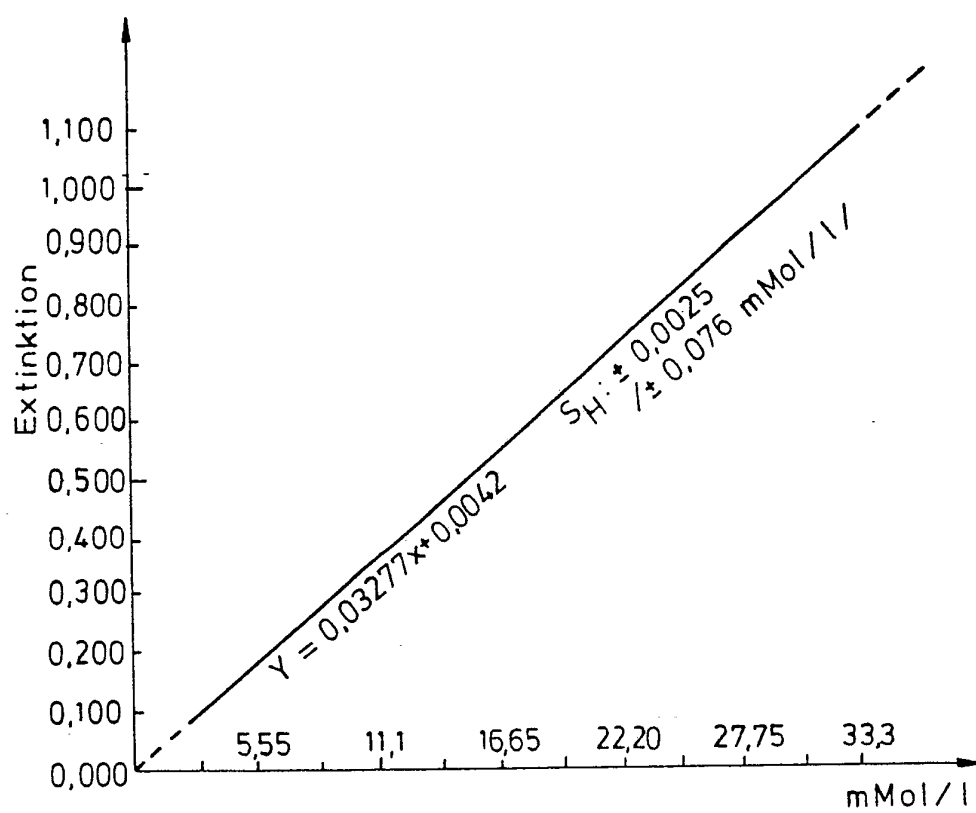


Abb.1

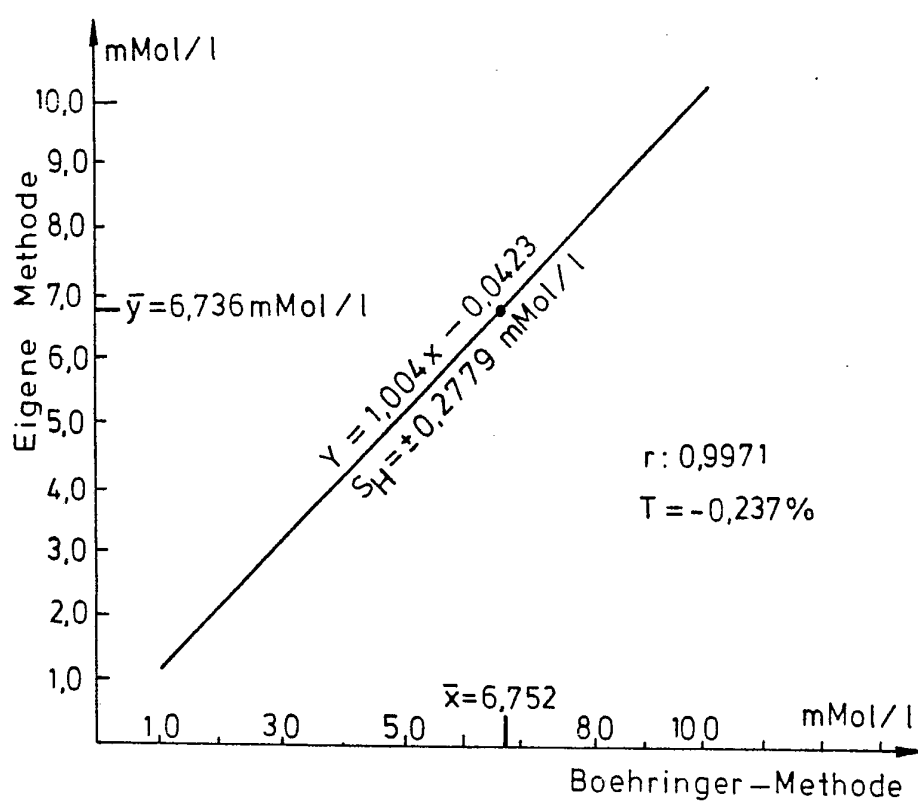


Abb. 2

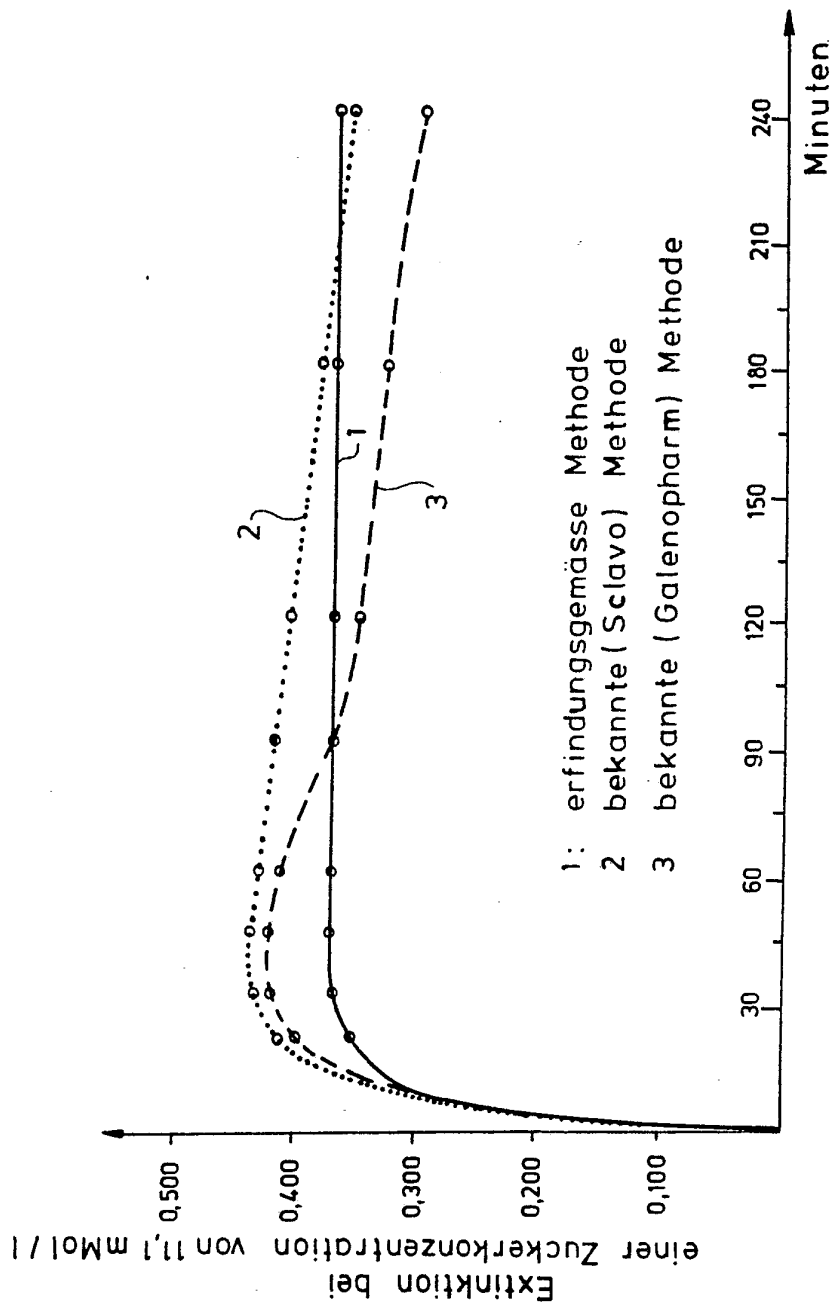


Abb. 3