

(19)



(10) **LT 3136 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3136**

(51) Int.Cl.⁵: **C12Q 1/54**

(21) Paraiškos numeris: **IP275**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 12 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 07 15**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 01 31**

(31,32,33) Prioritetas: **8901515-0, 1989 04 25, SE**

(72) Išradėjas:

Jan Evert Lilja, SE

Sven-Erik Lennart Nilsson, SE

(73) Patento savininkas:

MIGRATA UK LTD, 2 Duke Street, St James's, London SW1, Y6BJ, GB

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Bendro gliukozės kiekio gryname neatskiestame kraujyje nustatymo būdas, jo realizavimui skirta kompozicija ir jos panaudojimo būdas

(57) Referatas:

Aprašyti analizės būdas, kompozicija, skirta kiekybiniam gliukozės nustatymui gryname neatskiestame kraujyje, ir jos panaudojimo būdas. Gryno neatskiesto kraujo pavyzdį suliečia su sauso pavidalo kompozicija, kurią sudaro šie komponentai: gliukozės dehidrogenazė (GDH), viena arba keletas medžiagų, priklausančių grupei, kurios sudėtis tokia: diaforazė, fenazinmetosulfatas, fenazinetosulfatas, fenazinfenosulfatas, Mendolo mėlis; viena arba keletas medžiagų, paimtų iš grupės, kurios sudėtis tokia: NAD (nikotinamidinis dinukleotidas), NADF, tio-NAD, tio-NADF, nikotinamidpurino dinukleotidas, nikotinamidmetilpurino dinukleotidas, nikotinamid-2-ch'ormetilpurino dinukleotidas; viena arba keletas hemolizinių medžiagų, priklausančių grupei, kurios sudėtis tokia: fosfolipazė, hemoliziniai saponiniai ir hidrofiliniai mono-, di- arba trisacharidai bei alifatiniai angliavandeniliai iš 10-16 anglies atomų; oksidacinis-redukcinis indikatorius-dažas; galima papildyti mutarotaze. Gryno neatskiesto kraujo su nurodytu reagentu reakcijos metu keičiasi spalva, kuri yra registruojama spektrometru (pralaidumo režime).

Šis išradimas skirtas gliukozės nustatymui, o konkrečiau - kiekybiniam gliukozės nustatymui gryname neatskiestame kraujyje. Šis išradimas taipogi numato analizės kompoziciją bei jos panaudojimą.

5 Gliukozės nustatymas kraujyje yra reikalingas klinikinės chemijos kasdieniniuose tyrimuose. Šie tyrimai panaudojami diagnostikai ir terapijai sergantiems diabetu bei medžiagų apykaitos susirgimais.
10 Yra žinomi keli kiekybinio gliukozės nustatymo būdai gryname neatskiestame kraujyje.

Vienas iš jau žinomų čia nurodytų būdų pagrįstas fermentiniu gliukozės nustatymu, panaudojant gliukozės
15 dehidrogenazę; kompozicija, atitinkanti šį būdą, aprašyta JAV patente 4120755. Nurodyta kompozicija sudaryta iš buferio piridoninio koenzimo ir gliukozės dehidrogenazės. Čia buferio sąvoka reiškia pH kitimą nuo 7,9 iki 9,0. JAV patente 3 964 974 žinoma kita
20 kompozicija, skirta gliukozės nustatymui. Nurodytos kompozicijos pagrindiniai elementai yra šie: gliukozės dehidrogenazė, kuriai keliama tam tikri reikalavimai švaros ir tipo atžvilgiu, piridoninis koenzimas, pavyzdžiui, NAD (nikotinamidinis dinukleotidas),
25 buferinė sistema skirta palaikyti tam tikrai pH reikšmei junginio vandeniniame tirpale (tarp 6,5 ir 8,5) ir mutarotazė. Nei viename iš nurodytų dviejų patentų nenumatytas nei būdas, nei kompozicija, tinkantys tiesioginiam kiekybiniam gliukozės nustatymui
30 gryname neatskiestame kraujyje, tai yra nei atskiedus, nei nusodinus. Vienintelė informacija, skirta gliukozės nustatymui gryname kraujyje, aprašyta JAV patento 3964974 7-ajame pavyzdyje, kur nurodyta "drėgnos" gliukozės cheminė analizė, naudojant gryno kraujo
35 pavyzdį. Prieš atliekant šią analizę, iš gryno kraujo pavyzdžio pašalinami proteinais. Pašalinus proteinus, gali nebelikti raudonųjų kraujo kūnelių. Todėl

gliukozės nustatymas atliekamas ne gryname kraujyje. Būtina atkreipti dėmesį į nurodyto JAV patento aprašymo 9 psl. 19-24 eilutes, kur nurodoma, kad negalima išsaugoti raudonųjų kraujo kūnelių, nustatant gliukozės kiekį gryname kraujyje. Deproteinizavus neatskiestą kraują ir prieš praleidžiant, jis sumaišomas su fermento iš buferio tirpalu. Reakcija pradedama, įvedant koenzimo (NAD) tirpalą, o po to nustatomas gliukozės kiekis. Taip pat nurodoma, kad gliukozė gali būti nustatyta, panaudojant dažą arba spalvotą reakciją kaip indikatorių, parodanti NADN buvimą, pavyzdžiui, tetrazolio druską hidrogenezuoja į atitinkamą formazoną, veikiant diaforazės fermentu. Bet nurodytame šaltinyje nenumatomas šios metodikos taikymas, panaudojant NADN indikavimą, skirtą gliukozės nustatymui tik kraujo plazmoje. JAV patente 3 964 074, pavyzdžiui, 6-jame pavyzdyje gliukozė kraujyje nustatoma tiriant atskiestą kraują, priešingai, nei šiame išradime, kuriame gliukozė nustatoma tiesiogiai neatskiestame kraujyje.

Aišku, kad paprasto ir greito testo sukūrimas kiekybiniam gliukozės nustatymui gryname neatskiestame kraujyje yra darbu klinikinėje laboratorijoje vertingas patobulinimas.

Vienas šio išradimo tikslų yra kiekybinis gliukozės nustatymo gryname neatskiestame kraujyje patobulinimas, panaudojant spektrofotometriją pralaidumo režime.

Kitas šio išradimo tikslas yra tinkamiausias sausos kompozicijos parinkimas, naudojamas kiekybiniam nustatymui. Šis išradimas gali būti taikomas kiekybiniam gliukozės nustatymui mažuose gryno neatskiesto kraujo kiekiuose. Išsireiškimas "mažas tūris" suprantamas kaip tūris, esantis tarp 0,1 ir 0,001 ml, o geriau, jei tarp 0,02 ir 0,001 ml.

Remiantis šiuo išradimu, kraujo geriau ne tik kad neskiesti, bet dar ir nemėginti kaip nors apdoroti.

Pirmiausia, šiame išradime numatytas kiekybinis gliukozės gryname neatskiestame kraujyje nustatymo būdas pasižymi tuo, kad gyno neatskiesto kraujo pavyzdys, kurio tūris, geriau jei būtų mažesnis nei 20 ml, kontaktuoja su sauso pavidalo reagentu, į kurio sudėtį įeina:

- gliukozės dehidrogenazė (GDH);
- vienas arba keletas junginių, priklausančių grupei, sudarytai iš diaforazės, fenazinmetosulfato, fenazinetosulfato, fenazinfenosulfato ir Meldolo mėlio;
- vienas arba keletas junginių, priklausančių grupei, kurios sudėtis tokia: NAL (nikotinamidinis dinukleotidas), NADF, tio-NAD, tio-NADF, nikotinamidpurino dinukleotidas, nikotinamidmetilpurino dinukleotidas, nikotinamid-2-chlormetilpurino dinukleotidas;
- viena arba keletas hemolizinių medžiagų, priklausančių grupei, sudarytai iš fosfolipazės, hemolizinių saponinų ir hidrofilinių mono-, di- arba trisacharidų ir alifatinių angliavandenilių, turinčių 10 - 16 anglies atomų;
- oksidacinis-redukcinis indikatorius-dažas;
- galima papildyti mutarotaze; ir nurodyto reagento su gliukoze gryname neatskiestame kraujyje reakcijos metu besikeičiančios spalvos registracija spektrofotometrijos metodu pralaidumo režime.

Priemonės, skirtos tam, kad vyktų nurodytas būdas, yra aprašytos JAV patente 4 088 448.

5 Antra šiame išradime numatyta kompozicija, skirta gliukozės kiekio nustatymui gryname neatskiestame kraujyje, pasižymi tuo, kad ji sausame pavidale yra ir ją sudaro:

- gliukozės dehidrogenazė (GDH);
- 10 - vienas arba keletas junginių, priklausančių grupei, sudarytai iš diaforazės, fenazinmetosulfato, fenazinetosulfato, fenazinfenosulfato ir Meldolo mėlio;
- 15 - vienas arba keletas junginių, priklausančių grupei, kurios sudėtis tokia: NAD (nikotinamidinis dinukleotidas), NADF, tio-NAD, tio-NADF, nikotinamidpurino dinukleotidas, nikotinamid-2-
- 20 chlormetilpurino dinukleotidas;
- viena arba keletas hemolizinių medžiagų, priklausančių grupei, sudarytai iš fosfolipazės, hemolizinių saponinų ir hidrofiliinių mono-, di- arba trisacharidų ir alifatinių angliavandenilių,
- 25 turinčių 10 - 16 anglies atomų;
- oksidacinis-redukcinis indikatorius-dažas;
- 30 - galima papildyti mutarotaze.

Trečia, šiame išradime numatomas nurodytos kompozicijos panaudojimas, pasižymintis tuo, kad į jos sudėtį įeina:

35

- gliukozės dehidrogenazė (GDH);

- vienas arba keletas junginių, priklausančių grupei, sudarytai iš diaforazės, fenazinmetosulfato, fenazinetosulfato, fenazinfenosulfato ir Meldolo mėlio;
- 5 - vienas arba keletas junginių, priklausančių grupei, kurios sudėtis tokia: NAD (nikotinamidinis dinukleotidas), NADF, tio-NAD, tio-NADF, nikotinamidpurino dinukleotidas, nikotinamid-2-chlormetilpurino dinukleotidas;
- 10 - vienas arba keletas hemolizinių medžiagų, priklausančių grupei, sudarytai iš fosfolipazės, hemolizinių saponinų ir hidrofilinių mono-, di- arba trisacharidų ir alifatinių angliavandenilių, turinčių 10 - 16 anglies atomų;
- oksidacinis-redukcinis indikatorius-dažas;
- 20 - galima papildyti mutarotaze; be to, imama nurodyta sauso pavidalo kompozicija, skirta kiekybiniam gliukozės nustatymui gryname neatskiestame kraujyje, panaudojant spektrofotometrijos metodo pralaidumė.

25

Šiame išradime aprašytos kompozicijos komponentų sudėtis nėra kritinis faktorius, bet geriau, kai ji yra nurodytose ribose, skirtose vienam gryno neatskiesto kraujo ml:

30

Medžiaga	Kiekis
Gliukozės dehidrogenazė	5-500 aktyvumo vienetai
Diaforazė arba analogai	1-100 aktyvumo vienetų
	10,1-30 mmol.
NAD ir analogai	1-100 mmol
Fosfolipazė arba analogai	1-1000 aktyvumo vienetų/0,5-70 mg

Mutarotazė 0,1-10 aktyvumo vienetų
Oksidacinis-redukcinis
indikatorius-dažas 5-100 mmol

Į pagrindinę kompoziciją galima pridėti skirtingų
komponentų, optimizuojančių funkcinę analizę, skirtą
įvairiems pritaikymams. Norint alfa-gliukozę greitai
5 paversti į beta-gliukozę, galima panaudoti mutarotazę,
nes būtent pastaroji reaguoja su gliukozės
dehidrogenaze. Tai ypač idomu, kai analizuojamas
pavyzdys nėra paimtas tiesiog iš paciento. Gliukozės
dehidrogenazė specifiškai veikia į beta-gliukozės
10 skilimą. Alfa- ir beta-gliukozė vandeniniuose
tirpaluose yra pusiausvyroje, ir priklausančioje nuo
temperatūros, kuri nusistovi palyginti lėtai. Kadangi
kūno temperatūra gana pastovi, tai mutarotazę, kuri
pagreitina pusiausvyros nusistovėjimą, gali būti
15 pašalinta iš reagento, imami pavyzdžiai iš kraujo,
turinčio kūno temperatūrą. Šio varianto privalumai:
pigumas, trumpas reakcijos laikas ir analitinio
diapazono praplėtimas. Trūkumas toks, kad tirpalai,
skirti kalibravimui ir kontrolei, turi pasiekti
20 nurodytą temperatūrą, o tai trunka mažiausiai vieną
valandą.

Į reagentą galima pridėti medžiagų, stabilizuojančių pH
nurodytame diapazone, tam, kad galėtų vykti reakcija pH
25 diapazone, atitinkančiame fermento aktyvumą.

Į reaktyvą taipogi galima įterpti medžiagas,
veikiančias junginio tirpumą bei stabilumą. Tai svarbu
tam tikrais atvejais.

30

Iš skirtingų medžiagų su skirtingomis molekulinėmis
masėmis bei pH optimaliais variantais galima gauti
gliukozės dehidrogenazę. Šiame aprašyme gliukozės
dehidrogenazė suprantama tik kaip fermentai, sudaryti

iš NAD (nikotinamidinio dinukleotido) - arba NAD analogų - panašių tipų; i jų skaičių neįeina tokie tipai, kurie priklauso nuo deguonies ir funkcionuoja su kininiais koenzimais, kurie taip pat vadinami gliukozės dehidrogenazėmis.

Diaforazė taip pat gali būti gauta iš skirtingų medžiagų, tačiau ją gali pakeisti kitos žinomos medžiagos, pavyzdžiui, fenazinmetosulfatas, Meldolo mėlis ir t. t. Taipogi žinomi ir kiti NAD (nikotinamidinis dinukleotidas) analogai, iš jų populiariausias yra NADF, kuris gali būti atnaujintas gliukozės/gliukozės dehidrogenazės reakcija ir gali atnaujinti dažą arba spalvinę sistemą.

Tam, kad palengvinti paviršių sudrekinimą ar patenkinti kitus poreikius, gali prireikti paviršinės-aktyvios medžiagos. Medžiagos, žeminančios paviršinę įtampą, gali būti įterpiamos, kad palengvintų hidrofiliinių plastiko paviršių padengimą.

Tam, kad palengvinti suspensijos adaptaciją prie įvairių rūšių paviršių, keičiamas jų klampumas, pridedant tinkamų stambiamolekulinių polimerų. Nurodytų stambiamolekulinių polimerų parinkimas nėra kriterijus, tačiau jis veikia sauso reaktyvo ištirpimo greitį. Tarp naudojamų polimerų paminėtini: polietilenglikolis, polivinilpirolidonas, dekstranas ir įvairūs celiuliozės dariniai. Be to, polimerai gali būti parinkti ir tam, kad stabilizuotų suspensiją. Remiantis žinomais junginio gavimo būdais, taikomais, pavyzdžiui, maisto arba kosmetinėje pramonėje, praktiškai galima išspręsti bet kurias problemas, iškilančias reagentui adaptuojantis prie įvairių paviršių.

Medžiagos, žeminančios paviršinę įtampą, gali pasižymėti hemoliziniu efektu. Taip yra su denoil-N-

metilgliukamidu. Šis faktas leidžia panaudoti įvairias tokių medžiagų kombinacijas. Taip pat yra hemolizinės medžiagos, kurios pasižymi ypatingu paviršiniu aktyvumu, pavyzdžiui, melitinas ir fosfolipazės.

5

Yra žinomi kai kurie medžiagų tipai, keičiantys spalvą, ir kurie gali keisti spalvą, veikiant NADF ir diaforazei. Tinkamiausiais yra laikomi tetrazolo dariniai, nes dažas formazanas negrižtamai susiformuoja, esant normalioms reakcijos sąlygoms. Geri rezultatai gaunami, kai kompozicijoje naudojami 3-(4,5-dimetiltiarol-2)-2,5-difenil-2H-tetrazolijbromidas (MMT), bet galima naudoti kitus tetrazolo darinius. Tenka pažymėti, kad hemolizinių junginių grupę sudaro tik tokios medžiagos, kurioms sąveikaujant su tetrazolo dariniais nesusidaro nepageidaujamos nuosėdos.

10
15

Išradimą iliustruoja pavyzdžiai ir juos atitinkantys brėžiniai.

20

Fig.1 schematiškai atvaizduota reakcija ir junginių formulės.

25

Fig.2 duota diagrama, kurios duomenys pateikti I-ojoje lentelėje ir kuri iliustruoja pasiskirstymą ir su lyginamuoju metodu bei statistiniu apdorojimu susietą koreliaciją, kurie reikalingi naudojantis "galinio taško" metodu.

30

Fig.3 duoti grafikai, skirti baigtinio taško nustatymui.

Fig.4 duoti hemoglobino, MTT-formazano palyginimo bei bangų ilgio spektrai.

35

Fig.5 duota diagrama, iliustruojanti koreliaciją su lyginamuoju metodu kinetiniuose tyrimuose.

Siekiant gauti skirtingus gliukozės lygius, matavimai atliekami su gryno kraujo pavyzdžiais, paruoštais su gliukoze. Lyginamąjį metodą sudaro firmos "Merk" testinė sistema. Svarbiausia yra gliukozės dehidrogenazė (Gliuk-0 metodas - DH(R), 13 886 tipas, 13 887). Nurodytam lyginamajam metodui spektroskopinis nustatymas atliekamas UF spektro srityje, esant 340 nm, pagal pridedamą testavimo instrukciją. Lyginamasis būdas yra cheminis analitinis "drėgno" tipo būdas.

1 pavyzdys

Reagento kompozicijos kiekis 1 ml.

- 15 100 aktyvumo vienetų gliukozės dehidrogenazė (firmos "Merk" produktas)
- 20 20 aktyvumo vienetų diaforazė (firmos "Merk" produktas)
- 22 mol NAD (firmos "Merk" produktas)
- 30 mol MTT (firmos "Merk" produktas)
- 25 25 mg balto saponino (firmos "BDN" produktas)
- 5 mg dekanoil-N-metilgliukamido
- 30 1 ml vandens (apdorotas jonų mainais).

Gaunamas tirpalas, tinkantis džiovinimui užšaldant mikrokiuvetėse, gautose inžekciniu formavimu, kuris aprašytas JAV patente Nr. 4088448 ir yra (Hemocuē - AB) firmos pramoninis produktas. Matavimai atliekami, naudojant "galinio taško" metodą, esant 660 nm, o palyginimui naudojamas 880 nm bangos ilgis.

2 pavyzdys

Reagento kompozicijos kiekis 1 ml.

5 Gliukozės dehidrogenazė 1000 aktyvumo vienetų (firmos "Merk" produktas)

200 aktyvumo vienetų diaforazė (firmos "Merk" produktas)

10

220 mol NAD (firmos "Merk" produktas)

0,3 mol MTT (firmos "Merk" produktas)

15

250 mg balto saponino (R) (firmos "BDN" produktas)

50 mg Pliuronik P 85 (R) (firmos "Serva" produktas)

20

250 mmol vandens (apdorotas jonų mainais)

Junginio komponentai susmulkinami taip, kad gauta suspensija būtų tinkama paviršių padengimui, tinkamų spausdinimo būdams, pavyzdžiui, spausdinimui ant šilko arba pasinaudojant spausdinimo cilindrais ir t. t. Ši suspensijos rūšis yra tinkama mikrokiuvetėms su skiriamaisiais paviršiais, aprašytais JAV patente Nr. 4088448.

30

3 pavyzdys

Mikrokiuvetės, atitinkančias JAV patentą Nr. 4 088 448, pagamintas iš celiuliozės acetato-celiuliozės butirato maždaug 0,15 mm gylio padengia reagento kompozicija, aprašyta 2 pavyzdyje, spausdinimo įrenginiu (4 spausdinimo ciklai). Išdžiovinus ir surinkus, buvo

35

tiriamas kiuvečių funkcionavimas, skirtas viso kraujo įvairių pavyzdžių analizei. Hemolizę nustatydavo, esant 660 nm bangos ilgiui; matavimo trukmė tęsėsi nuo 20 iki 40 sekundžių, priklausomai nuo eritrocitų kiekio.

5 Nusidažymas buvo tiriamas esant tam pačiam bangos ilgiui; viso kraujo pavyzdžiai, kurių gliukozės koncentracija sudaro 12 mmol/l, pasiekia baigtinį tašką, atitinkantį matavimų metodikas, maždaug po 1,5 min. (žiūrėti fig. 3). Fig.4 duoti hemoglobino ir dažo

10 spektrai gryno kraujo pavyzdžiui, kuriame gliukozės koncentracija yra apie 12 mmol/l kiuvetėje, pagal 3 pavyzdį. Akivaizdu, kad šiuo atveju turime geras galimybes įvertinti susidariusį formazaninį nusidažymą, išvengiant nepageidaujamo persidengimo su hemoglobinu;

15 taip pat susidaro galimybė pakeisti bendrą fono drumstumą nenurodytuose spektruose. Keičiant padengto sluoksnio storį, savaime suprantama, keičiasi reakcijos laikas bei maksimaliai nustatomos koncentracijos.

20 4 pavyzdys

Reagento kompozicijos kiekis, 1 ml.

25 25 aktyvumo vienetų gliukozės dehidrogenazė su

25 maksimaliu polietilenglikolaldehido metileteriu (750)

5 aktyvumo vienetų diaforazė (firmos "Merk" produktas)

30 7 mol NAD (firmos "Merk" produktas)

20 mol MTT (firmos "Merk" prodktas)

25 mg balto saponino (R) (firmos "BDN" produktas)

35

1 ml vandens (apdorotas jonų mainais)

Šiuo būdu gaunamas tirpalas, tinkantis džiovinimui užšaldant analogiškai pavyzdžiui. Reagentas paruošiamas kinetiniams tyrimams, priešingai buvusiems pavyzdžiams, kur nustatoma, remiantis galiniu tašku. Santykinai

5 didelis gliukozės dehidrogenazės kiekis surištas su redukcijos aktyvumu, vykstančios susiuvant polimero molekulę. Yra žinoma, kad polimero molekulių susiuvimas su fermentu padidina stabilumą, o tai yra pageidautina sąlyga, vykstant kinetinius tyrimus. Tinkamiausių

10 polimerų parinkimas nebuvo atliekamas; šis pavyzdys tik parodo panašių polimerų panaudojimo galimybę. Polietilenglikolio monometilo eterį paverčia į aldehydą, veikiant dimetilsulfosidu ir acto rūgšties anhidridu susirišus su gliukozės dehidrogenaze esant

15 natro chloride karbonatiniam buferiui prie $\text{pH}=10$ ir esant polimero pertekliui, mišinys yra dializuojamas ir koncentruojamas. Komplexas fermentas-polimeras yra žymiai stabilesnis, nei grynas fermentas. Gauti rezultatai, atlikus kinetinius matavimus su duoto

20 pavyzdžio reagentu, pateikiami fig. 5. Matuojama esant 660 nm, 3-3,75 min. laikotarpyje o po palyginimo bangos ilgis - 880 nm.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Bendro gliukozės kiekio gryname neatskiestame kraujyje nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s
5 tuo, kad neatskiesto kraujo pavyzdys, geriau mažesnio tūrio nei 20 l, kontaktuoja su sausu reagentu, susidedančiu iš:

- gliukozės dehidrogenazės (DHG);
10
- vieno junginio arba keleto junginių grupės, sudarytos iš diaforazės, fenazinmetosulfato, fenazinetosulfato, fenazinfenosulfato ir Meldolo melio;
15
- -vieno junginio arba keleto junginių grupės, sudarytos iš NAD(nikotinamidinio dinukleotido), NADF, tio-NAD, tio-NADF, nikotinamidpurino dinukleotido, nikotinamidmetilpurino dinukleotido,
20 nikotinamid-2-chlormetilpurino dinukleotido;
- vienos arba keleto hemolizinių medžiagų, priklausančių grupei, sudarytai iš fosfolipazės, hemolizinių saponinų ir hidrofiliinių mono-, di-
25 arba trisacharidų ir alifatinių angliavandenilių, turinčių 10-16 anglies atomų;
- oksidacinio-redukcinio indikatoriaus-dažo;
- galima papildyti mutarotaze; ir nurodyto reagento
30 su gliukoze gryname neatskiestame kraujyje reakcijos metu besikeičiančios spalvos registracija spektrofotometrijos metodu pralaidumo režime.

35 2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gyno kraujo pavyzdžio kiekį ima mažesni nei
20 l:

3. Kompozicija, skirta gliukozės kiekio nustatymui
gryname neatskiestame kraujyje, b e s i s k i r i a n -
t i tuo, kad ji yra sausame pavidale ir susideda iš:

- 5 - gliukozės dehidrogenazės (DHG);
- vieno junginio arba keleto junginių grupės,
 susidedančios iš diaforazės, fenazinmetosulfato,
 fenazinetošulfato, fenazinfenosulfato ir Meldolo
- 10 mėlio;
- vieno junginio arba keleto junginių grupės,
 susidedančios iš NAD(nikotinamidinio dinuk-
 leotido), NADF, tio-NAD, tio-NADF, nikotinamid-
- 15 purino dinukleotido, nikotinamidmetilpurino dinuk-
 leotido, nikotinamid-2-chlorometilpurino dinukleo-
 tido;
- vienos arba keleto hemolizinių medžiagų,
- 20 priklausančių grupei, sudarytai iš fosfolipazės,
 hemolizinių saponinų ir hidrofiliinių mono-, di-
 arba trisacharidų ir alifatinių angliavandenilių,
 turinčių 10-16 anglies atomų;
- 25 - oksidacinio-redukcinio indikatoriaus-dažo;
- galimą papildyti mutarotaze.

4. Kompozicija pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n -
30 t i tuo, kad nurodytas oksidacinis-redukcinis
 indikatorius-dažas yra tetrazolino druska.

5. Kompozicija pagal 3 arba 4 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad į jos sudėtį įeina:

35

- gliukozės dehidrogenazė;

- diaforazė, NAD(nikotinamidinis dinukleotidas);

- vienas arba keletas saponinų; ir

5 - galima papildyti mutarotaze.

6. Kompozicijos, į kurias sudėti įeina:

- gliukozės dehidrogenazė (DHG);

10

- vienas junginys arba keletas junginių grupė, sudaryta iš diaforazės, fenazinmetosulfato, fenazinetosulfato, fenazinfenosulfato ir Meldolo mėlis;

15

- vienas junginys arba keletas junginių grupė, sudaryta iš NAD(nikotinamidinio dinukleotido), NADF, tio-NAD, tio-NADF, nikotinamidpurino dinukleotido, nikotinamidmetilpurino dinukleotido, nikotinamid-2-chlormetilpurino dinukleotido;

20

- viena arba keletas hemolizinių medžiagų, priklausančių grupei, sudarytai iš fosfolipazės, hemolizinių saponinų ir hidrofilinių mono-, di- arba trisacharidų ir alifatinių angliavandenilių, turinčių 10-16 anglies atomų;

25

- oksidacinis-redukcinis indikatorius-dažas;

30

- galima papildyti mutarotaze,

panaudojimas sausame pavidale bendro gliukozės kiekio nustatymui gryname neatskiestame kraujyje spektrofotometrijos metodu pralaidumo režime.

Fig.1

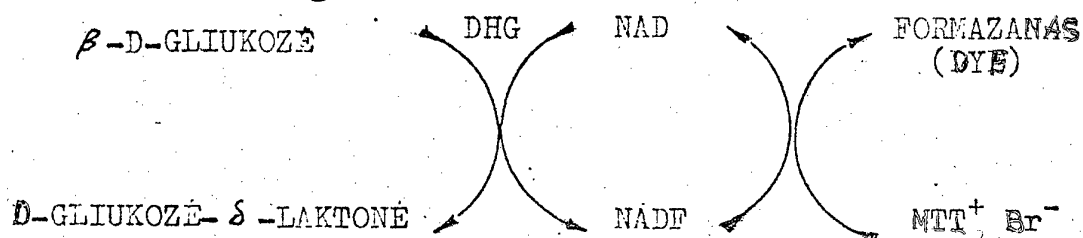


Fig. 3

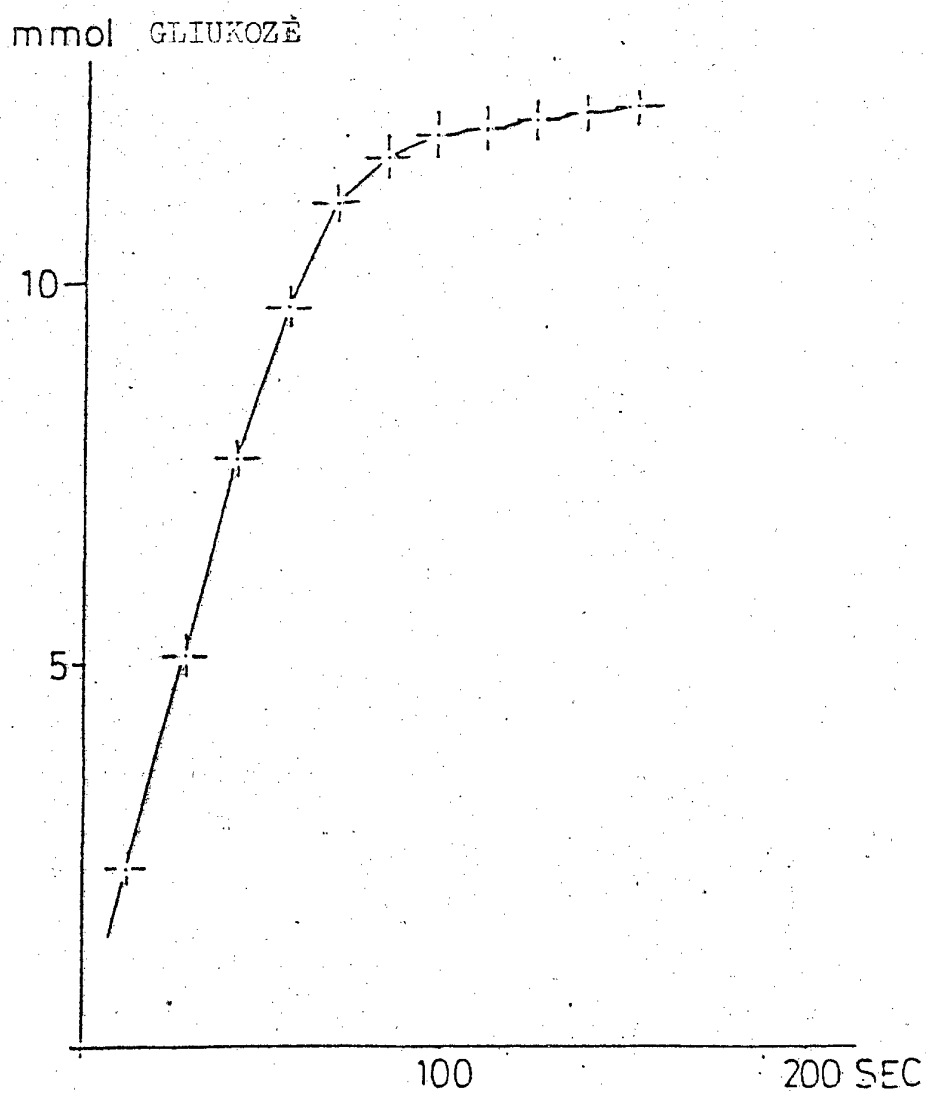


Fig.2

STANDARTINIS METODAS	METODAS PAGAL IŠRADIMĄ		LAIKAS IKI GALINIO
LYGIS mmol/l	LYGIS mmol/l	VK %	TAŠKO, s
3.64	3.8	3.3	53
5.90	6.1	2.5	71
8.44	8.6	2.4	77
12.78	13.0	2.0	99
17.97	17.7	1.5	119
22.13	21.8	1.5	145

VK - VARIACIJOS KOEFICIENTAS

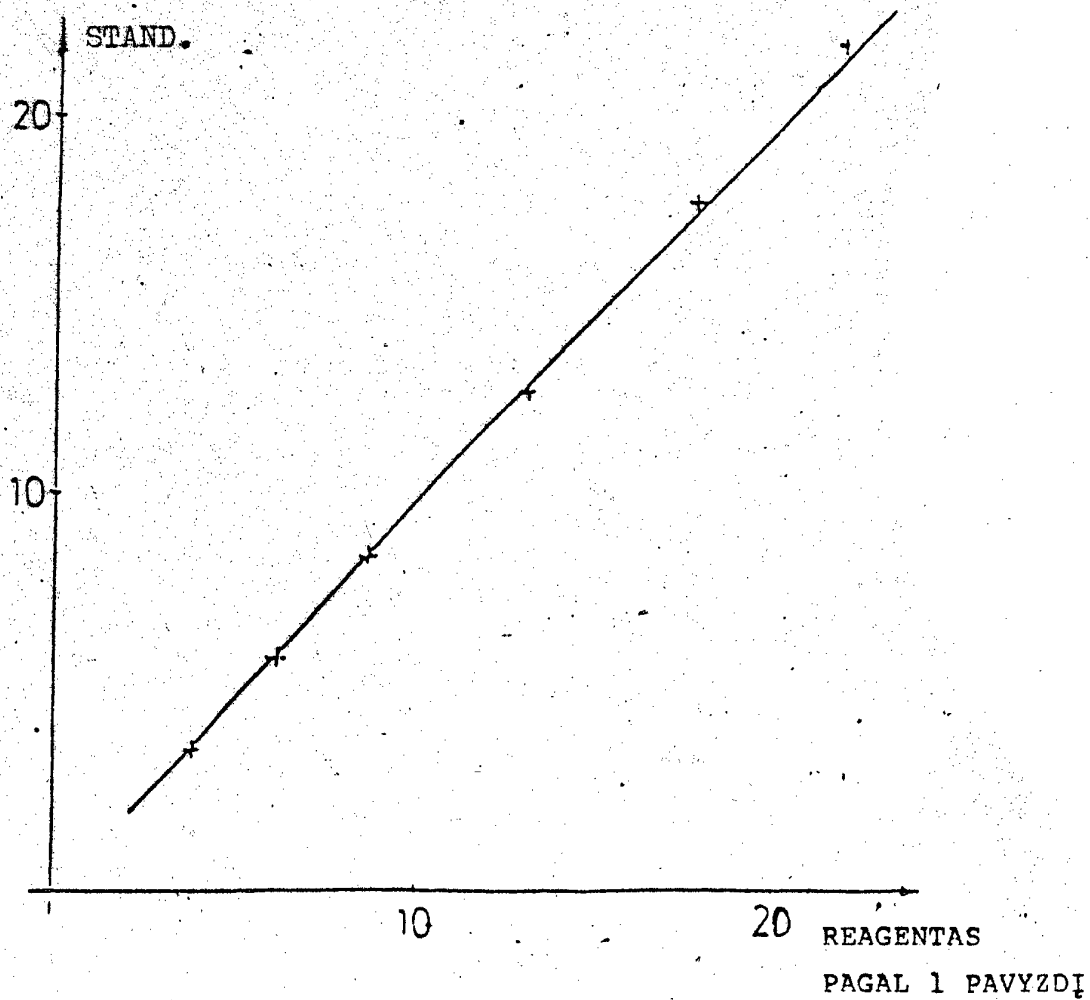


Fig. 4

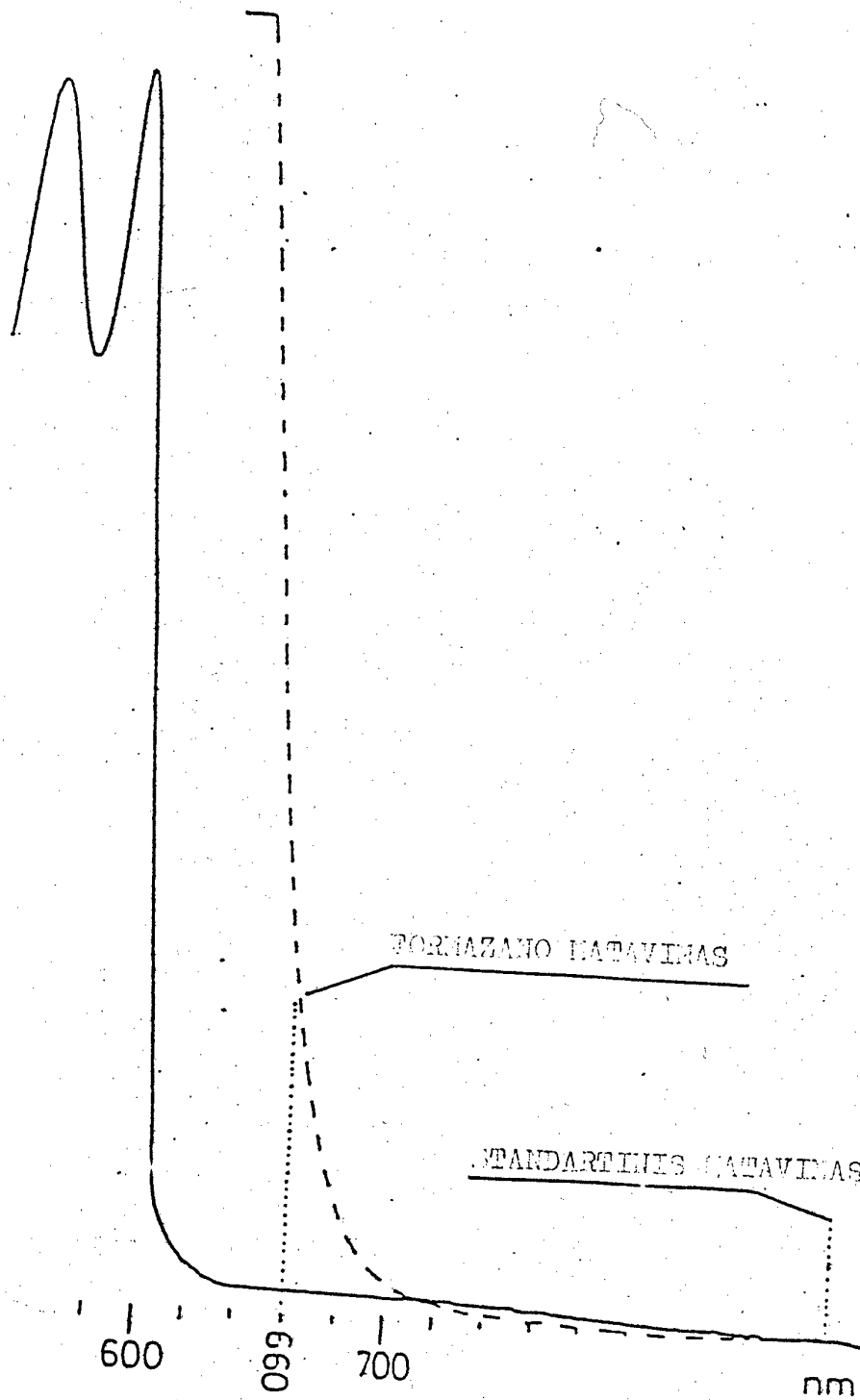


Fig.5

