



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

202073

(11)

(B2)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 31/22
G 01 N 31/20

/22/ Přihlášeno 30 06 77
/21/ /PV 4350-77/
/32//31//33/ Právo přednosti
od 30 06 76 /701403/
Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 03 83

(72) Autor vynálezu JOHNSON LEIGHTON CLIFFORD, EDWARDSBURG /Sp. st. a./

(73) Majitel patentu MILES LABORATORIES, INC., ELKHART /Sp. st. a./

(54) Zkušební prostředek a způsob jeho výroby

1

Vynález se týká zkušebního prostředku pro určování přítomnosti složky ve vzorku.

Rozvoj zkušebních prostředků formou zkušebních pásek umožnil pohodlně a rychle analyzovat různé typy vzorků biologických, průmyslových, proudících kapalin apod. V mnoha případech tyto diagnostické prostředky, určené k zjišťování různých klinicky významných látek nebo složek v biologických kapalinách, jako je moč a krev včetně krve, v níž došlo nebo nedošlo k lýze, krevní plazma a krevní sérum, významně předčí těžkopádné a časově náročné chemické rozboru mokrou cestou.

Tyto diagnostické prostředky přispěly k rychlé a přesné diagnóze a léčbě onemocnění. Běžné zkušební pásky obvykle obsahují absorpční nebo porézní nosič, nesoucí indikační reaktanty zpravidla kolorimetrického typu. Vzorek se zkouší tak, že se uvede do styku s nosičem například tím, že se nosič na chvíli ponoří do kapalného vzorku a po určitém časovém úseku se pozoruje indikovaný výsledek. Jako indikační pásek k určování stop krve v moči může být například užit diagnostický pásek, obsahující absorpční papír napuštěný o-tolidinem a peroxidem. Je-li tento pásek ponořen do moče obsahující stopy krve, dojde k rozkladu peroxidu a tím k oxidaci o-tolidinu, což vede k zabarvení. Zkouška je citlivá a vysoce užitečná pro diagnózu závad v močovém traktu. Protože však reaktivita použitých reaktantů je poměrně vysoká, skladová životnost se považuje za relativně krátkou a pásky mohou ztrácet delším skladováním na své citlivosti.

S podobnými problémy s reaktivitou reaktantů se lze shledat i u mnoha dalších typů pásek, které zahrnují více než jednu chemickou reakci. Například reaktanty k zkoušení množství ketonu, dusíku v moči a krvi a galaktózy jsou známy nízkou skladovou životností při skladování. Při zkoumání způsobů, jak prodloužit životnost zkušebních pásek při skladování, to jest 202073

způsobů, jak snížit relativní reaktivitu reaktantů, byly uskutečněny experimenty ověřující, zda by bylo možno oddělit reaktivní reaktanty fyzikálně na pásce samotné. O úspěšném oddělení navzájem reaktivních reaktantů nebylo před touto prací zatím referováno.

Pokusy byly úspěšné a bylo zjištěno, že zkušební pásky mohou být vskutku vyrobeny tak, že reaktivní reaktanty jsou fyzikálně odděleny do té doby, dokud nepříjdou do styku s analyzovaným vzorkem. Pásky, vyrobené podle předkládaného vynálezu, daleko předčí současné komerční pásky, které obsahují tytéž reaktanty.

Předmětem vynálezu je zkušební prostředek pro určování přítomnosti složky ve vzorku sestávající z nosiče se začleněným prvním reaktantem a druhým reaktantem, jehož podstata spočívá v tom, že reaktanty jsou schopny vzájemně reagovat v přítomnosti uvedené složky ve vzorku za vytvoření zjistitelné odezvy a první reaktant je natisknut na uvedený nosič v prvním seskupení vtisků a druhý reaktant je natisknut na nosiči v druhém seskupení vtisků, přičemž vtisky prvního seskupení jsou promíchány s vtisky druhého seskupení, ale zároveň jsou vtisky prvního seskupení odděleny od vtisků druhého seskupení.

Dále je předmětem vynálezu způsob výroby uvedeného zkušebního prostředku, jehož podstata spočívá v tom, že se vyrobí tisková barva s prvním reaktantem a natiskne se na nosič, vyrobí se druhá tisková barva s druhým reaktantem a natiskne se na nosič v seskupeních vtisků a vtisky prvního seskupení se natisknou promíchaně s vtisky druhého seskupení, ale jsou od nich odděleny.

Jiné a další výhody a stránky vynálezu se ozřejmí následujícím podrobným popisem příkladů provedení navazujících na připojený výkres, kde obr. 1 až 5 jsou diagramy, ilustrující různé vzory pro aplikaci reaktantů podle tohoto vynálezu.

Podle předkládaného vynálezu jsou nejméně dvě reagující látky odděleně uspořádány na nosiči podle opakujícího se vzoru. Optimální tvar z hlediska skladební hustoty a reakční difúze představují kruhové tečky. Tečky mohou být vtištěny tak, že se jedna druhé nedotýká a různé tečky lze nanášet podle potřeby ve stejném nebo různém počtu. Je-li to záhodno, je možno tečky nahradit tištěnými linkami o různé tloušťce a jinými vzory, například speciálními znaky.

Na obr. 1 je jeden reaktant znázorněn jako bílé body, druhý jako sousedící body černé. Toto uspořádání však není tím nejhustším. Body téhož reaktantu mohou být umístěny v řadě /jak je tomu na obr. 2 s reaktanty A a B/ nebo se mohou v řadě střídát /jak je tomu na obr. 3 s reaktanty A a B/.

Obr. 4 znázorňuje další vzor, vhodný pro případ, kdy se užívají tři různé reaktanty /A, B a C/. Na obr. 4 každá tečka reaktantu jednoho sousedí s šesti dalšími tečkami, obsahujícími vždy tři tečky každého ze zbývajících dvou reaktantů.

Jinou užitečnou technikou, jak oddělovat tištěné reaktanty, je nanášení pruhů na nosič. Pro systém o dvou reaktantech se tedy střídají pruhy doplňujících se reaktantů na nosiči paralelně, jako je tomu na obr. 5, přičemž plné čáry 1 představují první reaktant a přerušované čáry 2 představují druhý reaktant.

Předkládaný vynález se ukázal velmi užitečným při nanášení enzymů zachycených na polymerním nosiči. Enzymy jako glukóoxidáza mohou být vneseny do tiskové barvy, obsahující akrylamid a fotopolymerační iniciátor, jakým je například peroxisíran draselný.

Takováto tisková barva se na nosič může tisknout v podobě teček, pruhů či jiných konfigurací a po natištění exponovat rozptýleným světlem fotolampy s přežhavenou žárovkou.

Při jednom provedení této obzvláštní zachycovací techniky byl připraven zásobní roztok monomeru rozpouštěním 40 g akrylamidu ve 100 ml 0,1 M fosforečnanového pufru o pH = 7,4. Polymerační činidlo bylo připraveno rozpouštěním 2,3 g N,N-methylenbisakrylamidu ve 100 ml fosforečnanového pufru /pH = 7,4/. Gely mohly potom být připraveny mísením těchto roztoků v požadovaných poměrech zároveň s roztokem enzymu, jakým je například glukooxidáza. Tento gel může být vtištěn na inertní nosič v souhlasu s předkládaným vynálezem a vytvrzen in situ.

Další aplikace zachycených enzymů si odborník snadno vyvodí přihlédnutím k US patentům č. 3 788 950, 3 793 445, 3 841 971, 3 859 169 a 3 935 071.

Tyto a další odkazy na dřívější způsob diskutují podrobně fyzikální zachycování i enzymů kovalentně vázaných k substrátu a tyto techniky jsou snadno aplikovatelné na předkládaný vynález.

V obou výše uvedených případech, u toček i pruhů, lze pozorovat, že po smočení zkušebního prostředku se oddělené reaktanty slučují a reagují s analyzovanou složkou. Složení typických zkušebních reaktantů byla publikována v US patentech 3 438 737; 3 095 277; 3 212 855; 3 164 534; 3 050 373; 2 981 606; 3 123 443; 3 252 762; 3 290 117; 3 092 463; 3 012 976; 3 122 420; 3 453 180; 3 585 004 a 3 447 905, čímž se sem tyto včleňují odkazem.

Zkušební prostředek předkládaného vynálezu se optimálně vyrobí tiskařskými technikami. Například polystyrenový nosič může být potištěn tiskovou barvou obsahující první reaktant a potom tiskovou barvou obsahující druhý reaktant tak, že první i druhá tisková barva jsou vtištěny zcela bez vzájemného dotyku jako koplanární vtisky. Tak v případě zkušebního prostředku pro testování stop krve první tisková barva, obsahující o-tolidin, je sítotiskovou technikou nanášena na polystyrenový nosič v podobě množství teček. Potom se na nosič sítotiskovou technikou nanese množství druhých teček, sousedících s prvními. Tyto druhé tečky jsou tvořeny tiskovou barvou druhého reaktantu, obsahujícího peroxid, např. kumenhydroperoxid.

Jiným provedením předkládaného vynálezu je použití ofsetové tiskařské techniky. Příkladem využití předkládaného vynálezu touto technikou je použití pryžového razidla s vyvýšenými tečkami. Na pryžové razidlo se nanese tisková barva s prvním reaktantem a obtiskne na nosič, kde zanechá tečkovaný vtisk prvního reaktantu. Druhý reaktant se obtiskne podobně tak, aby jeho tečky sousedily s tečkami prvního reaktantu.

Poněkud jinou techniku výroby předkládaného zkušebního zařízení představují pruhy či pásy reaktantů, odděleně umístěné na nosiči. Tiskové barvy s reaktanty jsou pak nanášeny střídavě buď jako paralelní pruhy, nebo koncentrické kruhy.

Pro indikační barevnou změnu je obvykle žádoucí udržet indikující sloučeninu, tj. barvivo, v podobě oddělených, diskrétních oblastí na zkušebním prostředku. K zkoušení vzorků, založených na změnách pH, může být též žádoucí, aby se pufr zachycoval na zkušebním prostředku v oddělené oblasti, pokud zkouška probíhá.

Pro odborníka je zřejmé, že na předkládaný vynález lze aplikovat četné tiskařské techniky. Například je možno využít rotačního hlubotisku, sítotisku a ofsetového tisku. U výše uvedených způsobů se ukázalo, že přednost má sítotisk.

Pro sítotisk je preferovaným materiálem hedvábí, lze však použít i síť z jiných materiálů, jako síť z tkaného polyesteru, polyamidu nebo z kovových vláken. Obvykle se používá síť z umělého hedvábí, pokrytých standardními fotosenzitivními odolnými látkami. Po fotoexpozici na síť /např. požadovaného tečkovaného vzoru/ se exponované místo promývá, přičemž exponovaný vzor zůstává na síti. Tato technika není přirozeně novinkou a je v tiskařství příliš dobře známa, než aby zde vyžadovala další diskusi. Lze též využít perforovaných archů z takových materiálů, jako jsou plastické hmoty nebo kovové fólie. Perforovaných archů lze použít stejným způsobem jako síť tak, že se arch umístí na inertní nosič, nanese se na něj reaktant

a stěračem se roztírá tak, aby se reaktant rozprostřel po celé ploše a aby se protlačováním otvory obtiskl na nosič. Síta a archy musí být uloženy vzhledem k inertnímu nosiči přesně a nanášení reaktantů musí být takové, aby se dosáhlo žádaného výsledku, aniž by se reaktanty při nanášení nebo po něm slévaly. Velikost diskretních oblastí jednotlivých reaktantů, nanášených v známých poměrech, lze bez ohledu na užitou metodu měnit od velmi malých oblastí, tj. od velikosti mikroteček, až k relativně značným rozměrům. Parametry tiskařského přístroje rozhodují zpravidla o tom, zda oblastí reaktantu budou menší a těsnější.

Popsané tiskařské techniky mohou být použity na jakýkoli konvenční inertní nosič, užívající dříve pro diagnostická zkušební zařízení, jako je papír, plastické hmoty a jejich kombinace. Je nutno volit obzvláště takový inertní nosič, který adekvátně odráží dopadající světlo, neboť výsledky, poskytované zkušebním zařízením, se odečítají vizuálně, přičemž se posuzuje intenzita světla odráženého od takových zařízení. Jako nosiče lze využít opticky transparentních materiálů, jako je polystyrenová blána.

Je-li to žádoucí, může být papír, použitý jakožto nosič, povlečen, aby se zlepšil jeho účín při rozptylování světla a schopnost být potlaštěn, tj. přilnavost reaktantů. Povrch papíru může být bílé barvy, aby co nejlépe odrážel viditelné světlo pokud možno všech vlnových délek. Zpravidla se dává přednost matové úpravě před vysokým leskem.

Plastické nosiče mohou v podstatě mít tytéž optické vlastnosti, o nichž byla zmínka u papíru. Zatímco plastické hmoty mohou mít výhody, pokud se týče jejich menší chemické reaktivitu a stejnorodějšího odrazu, je přilnavost reaktantů k plastickým hmotám, při použití popsaných tiskařských technik, obtížnější, než k papíru. Je-li to žádoucí, lze do plastických hmot přidat bílý pigment, aby se dosáhlo požadované povrchové reflexe.

Do tištěných reagujících sloučenin podle tohoto vynálezu lze přidat známá ředidla, vhodná ke snížení hygroskopičnosti reaktantů, např. chloroform, tetrachlormetan, benzen apod., jakož i známá smáčecí činidla jako diglykollaurat, organické fosfátové estery anionických detergentů v etanolu apod., která pomáhají rovnoměrné difúzi barvy na zkušebním zařízení.

Zkušební zařízení může být v souladu s tímto vynálezem s výhodou vyrobeno ve formě dlouhých pásek, které se stočí a vloží do vhodného dávkovače tak, aby bylo možno odříznout jednotlivý zkušební proužek.

Následující příklady se uvádějí proto, aby vynález byl*jasněji popsán a aby byla předvedena význačná provedení. Není však záměrem žádným způsobem omezovat předkládaný vynález, takže příklady nelze takto interpretovat.

P ř í k l a d 1 - Střídavé proužky

Byly připraveny tyto dvě tiskové barvy s reaktanty:

Polymerní roztok: Byl připraven roztok acetaťové celulózy v acetonu. Tento roztok sloužil samostatně jako vehikulum pro každý reaktant.

Reaktant 1: V 65 ml vody bylo rozpuštěno 2,8 g citrátu sodného a 4,7 g kyseliny citronové. Potom bylo přidáno 50 mg tetrabromfenolové modři a 30 ml metanolu. Potom bylo upraveno pH na 3,3 přidáním pufru. 10 ml výsledné směsi bylo přidáno k 20 ml polymerního roztoku, čímž vznikla první tisková barva s prvním reaktantem.

Reaktant 2: 2,2 g citrátu sodného a 10 mg ortokresolnaftalensulfonátu /orthocresolsulphonaphthaline/ v 6 ml etanolu přidány k 24 ml vody a přidáním pufru bylo upraveno pH na 7,8. 10 ml této směsi bylo přidáno k 20 ml polymerního roztoku, čímž byla připravena druhá tisková barva s druhým reaktantem.

Byla vyrobena malá rozdělovací hlavice k nanášení obou inkoustů na polystyrenový nosič. Rozdělovací hlavice měla 14 kanálků o šíři 0,0762 cm. Dva rozdělovací vstupní otvory napájely střídající se sady kanálků. Tak první vstupní otvor přiváděl jednu tiskovou barvu k lichým

kanálkům 1, 3, 5, ... 13, a druhý vstup přiváděl druhou tiskovou barvu k sudým kanálkům 2, 4, 6, ... 14. Na každý ze vstupních otvorů byla dána dávka příslušné tiskové barvy a rozdělovací hlavice byla tažena přes bílý polystyrenový nosič, zanechávajíc přitom oddělené pruhy první i druhé tiskové barvy. Pruhovaný polystyrenový nosič byl potom rozřezán na pásy, široké asi 1,27 cm. Ty byly testovány roztokem 100 mg procent albuminu ve vodě a čistou vodou. Pásy, které byly ponořeny do albuminového roztoku, získaly žlutozelenou barvu, zatímco stejný pásek, ponořený do vody, získal barvu ostře žlutou.

P ř í k l a d 2 - Tištění teček ofsetem /autotypií/

Tento experiment byl realizován proto, aby demonstroval proveditelnost ofsetového tisku teček reaktantů. Pryžová deska pro tisk byla zakoupena od místního výrobce pryžových razidel. Výroba pryžových desek je v razítkářství dobře známa a deska pro tento experiment byla vyrobena s použitím kovové mosazné matrice, která obsahovala obvyklé tiskařské tečky v podobě ustupujících bodů. Tečky měly v průměru 0,0762 cm a byly čtvercově uspořádány v hustotě 64 teček na 5,588 cm². Na kovovou ražební formu byla položena nevulkanizovaná pryžová matrice a tlakem pryž vnikla do výdutí v kovové matici. Potom byla pryž vulkanizována teplem, čímž získala stálý tvar. Pryžový arch byl potom sloupnut, takže vznikla pryžová deska.

Pryžová deska byla rozříznuta na dva čtverce o délce strany 1,27 cm, čímž vznikly dvě ražební formy k tisku teček s reaktanty. Pomocí tmelu na pryž byla každá z ražebních forem upevněna na povrch hliníkového adaptéru k instalaci do malého dřevěného lisu, zakoupeného v obchodu.

Jako v příkladu 1 byly vyrobeny dvě tiskové barvy s reaktanty k nanesení na ražební formy. Jedna z ražebních forem byla namontována do lisu a pod ní byl do lisu upevněn kus polystyrenové blány. Ražební forma byla smočena tiskovou barvou s prvním reaktantem a barva byla natištěna na polystyrenovou blánu. Potom byla druhou tiskovou barvou smočena druhá ražební forma a namontována do lisu. Poloha plastické blány byla pozměněna takovým způsobem, aby tečky druhé ražební formy byly umístěny v sousedství teček prvních. Vytištěním druhých teček byla dokončena výroba zkušebního prostředku, který byl potom vysušen na vzduchu.

P ř í k l a d 3 - Tisk teček sítotiskem

Experiment předvádí aplikaci tohoto vynálezu na sítotiskový proces. Bylo použito standardní hedvábné síto vyrobené fotografickou cestou a obsahující vzory s tečkami o velikosti 0,0635 cm, 250 na 5,585 cm² a o velikosti 0,1016 cm, 185 na 5,585 cm². Vzor teček na sítu byl takový, že tečky byly tvořeny otvory, které umožňovaly, aby tisková barva mohla sítím protékat, zatímco ostatní místa vzoru průtok tiskové barvy neumožňovala.

Pod síto byl ve vzdálenosti 0,16 až 0,48 cm umístěn arch polystyrenové blány. Pomocí pravouhle seříznutého polyuretanového stíradla byla po sítu roztírána dávka tiskové barvy podle příkladu 1 s prvním reaktantem.

Tlakem na stíradlo se síto dotýkalo polystyrenu, na němž ulpěla série teček přibližně o stejné velikosti, jako byly otvory v sítu. Síto potom bylo vyčištěno a na polystyren byla nanesena druhá série teček za použití druhé tiskové barvy s druhým reaktantem podle příkladu 1 s tím rozdílem, že poloha síta byla pozměněna tak, aby druhé tečky byly umístěny v sousedství teček prvních. Potištěný polystyrenový arch byl potom sušen za okolní teploty, čímž vznikl použitelný zkušební prostředek.

Aby se podobně připravil vyhovující zkušební prostředek, byl technický postup opakován s většími tečkami. Z uvedeného je patrné, že tento vynález je dobře způsobilý k tomu, aby získal všechny z výše uvedených výhod zároveň s jinými výhodami, které jsou obvyklé a vlastní systému. Vynález zajišťuje rychlou a nenákladnou metodu nanášení reaktantů na zkušební prostředek takovým způsobem, který brání interakci reaktantů do té doby, dokud se zkušební

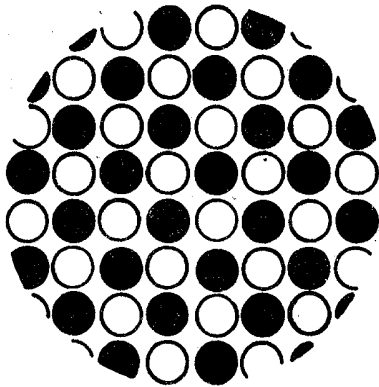
prostředek nedostane do styku se zkoumaným vzorkem. Životnost zkušebního prostředku při skladování se tak výrazně prodlužuje.

Přirozeně, že jsou možné četné další modifikace a variace vynálezu než ty, které byly uvedeny výše, aniž by se opouštěla podstata a rozsah vynálezu.

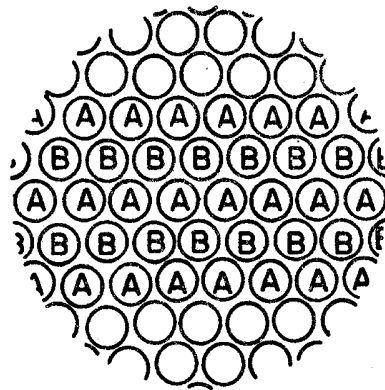
P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Zkušební prostředek pro určování přítomnosti složky ve vzorku sestávající z nosiče se začleněným prvním reaktantem a druhým reaktantem, vyznačený tím, že reaktanty jsou schopny vzájemně reagovat v přítomnosti uvedené složky ve vzorku za vytvoření zjistitelné odezvy a první reaktant je natisknut na uvedený nosič v prvním seskupení vtisků a druhý reaktant je natisknut na nosiči v druhém seskupení vtisků, přičemž vtisky prvního seskupení jsou promíchány s vtisky druhého seskupení, ale zároveň jsou vtisky prvního seskupení odděleny od vtisků druhého seskupení.
2. Zkušební prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že vtisky jsou tečky.
3. Zkušební prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že vtisky jsou rovnoběžné pásy.
4. Zkušební prostředek podle bodu 3, vyznačený tím, že rovnoběžné pásy střídavě obsahují první a druhý reaktant.
5. Zkušební prostředek podle bodu 2, vyznačený tím, že tečky jsou natisknuty v řadách obsahujících střídavě první a druhý reaktant.
6. Zkušební prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že první reaktant obsahuje o-tolidin a druhý reaktant obsahuje organický hydroperoxid, například kumenhydroperoxid.
7. Zkušební prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že jedním z reaktantů je enzym, zachycený na polymerním nosiči.
8. Zkušební prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že jedním z reaktantů je enzym kovalentně vázaný na substrát.
9. Zkušební prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že vtisky jsou tečky a nosičem je papír nebo plastická hmota.
10. Způsob výroby zkušebního prostředku podle bodu 1, vyznačený tím, že se vyrobí tisková barva s prvním reaktantem a natiskne se na nosič, vyrobí se druhá tisková barva s druhým reaktantem a natiskne se na nosič, přičemž první a druhá tisková barva se natisknou na nosič v seskupeních vtisků, vtisky prvního seskupení se natisknou promíchaně s vtisky druhého seskupení, ale jsou od nich odděleny.
11. Způsob podle bodu 10, vyznačený tím, že tiskové barvy se tisknou ofsetem.
12. Způsob podle bodu 10, vyznačený tím, že tiskové barvy se tisknou sítotiskem.
13. Způsob podle bodu 10, vyznačený tím, že tiskové barvy se tisknou hlubotiskem.

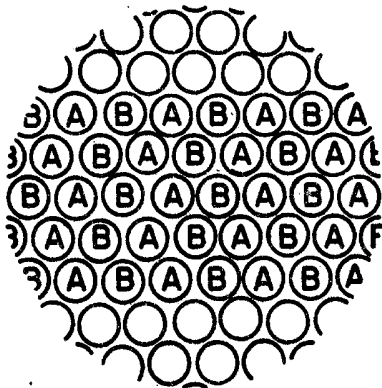
1 list výkresů



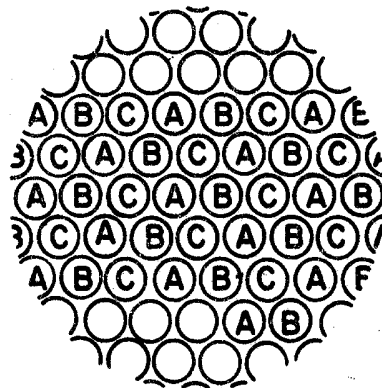
obr. 1



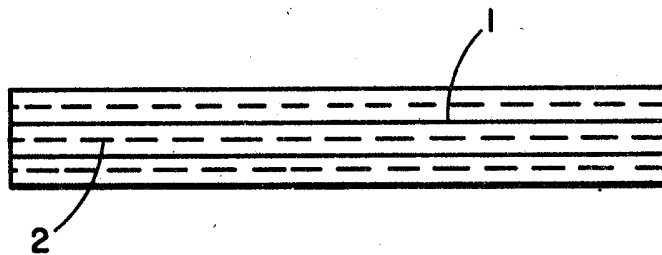
obr. 2



obr. 3



obr. 4



obr. 5