



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1201/84

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/52

(22) Indleveringsdag: 28 feb 1984

C 12 Q 1/28

(41) Alm. tilgængelig: 29 sep 1984

(44) Fremlagt: 10 sep 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 28 mar 1983 US 479126 02 feb 1984 US 575725

(71) Ansøger: *Miles Inc.; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46514, US

(72) Opfinder: Christine *Mayambala-Mwanika; US, Rodric H. *White-Stevens; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) **Materiale til detektering af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve, testmiddel indeholdende materialet samt fremgangsmåde til fremstilling af testmidlet.**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

carboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, idet mindst to af substituenterne R^1 , R^2 , R^3 , R^X eller R^Y er alkyl-carboxylsyre-grupper som defineret ovenfor,

(b) R^P og R^Q , der er ens eller forskellige, er lige eller forgrenede alkylengrupper med fra 1-3 carbonatomer eller divalente 1,3-cycloaliphatiske grupper med fra 6-9 carbonatomer,

(c) n er et helt tal fra 0 til 1, m er et helt tal fra 0 til 2, idet såfremt m er større end 0, gentagne R^P - og gentagne R^Q -gruppe kan være ens eller forskellige, og

(d) M betyder Fe^{+3} .

Et testmiddel til bestemmelse af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve omfatter en bærematrix, hvor i der er inkorporeret et materiale som det ovenfor beskrevne.

Et testmiddel til bestemmelse af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve, hvor testmidlet er resistent over for interfererende virkninger af ascorbat, der kan være til stede i prøven, kan fremstilles ved, at man

a) fremstiller en første reagensopløsning indeholdende et organisk hydroperoxid og et metalchelatat af et polycarboxyalkylamin-derivat med den ovenfor angivne formel,

b) inkorporerer den første reagensopløsning i en bærematrix ved fugtning af matrixen med den første opløsning,

c) tørrer den fugtede matrix til efterladelse af en remanens af metalchelatatet og hydroperoxidet,

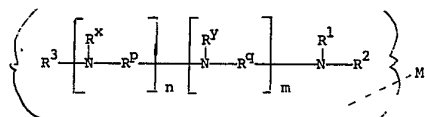
d) fremstiller en anden reagensopløsning indeholdende en indikator og et opløsningsmiddel, hvor indikatoren kan tilvejebringe et detekterbart respons i nærværelse af et peroxid og det peroxidativt aktive stof,

e) inkorporerer den anden reagensopløsning i den tørrede bærematrix ved fugtning af matrixen med den anden reagensopløsning, og

f) tørrer matrixen til efterladelse af en kombineret remanens indeholdende metalchelatatet, hydroperoxidet og indikatoren.

1201-84

Et materiale til detektering af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve omfatter et organisk hydroperoxid og en indikator, der er i stand til at tilvejebringe et detekterbart respons i nærværelse af det peroxidativt aktive stof og peroxid, og dette materiale indeholder yderligere et metalchelatat af et polycarboxyalkylamin-derivat med den almene formel



i hvilken

(a) R^1 er hydrogen eller lige eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, R^2 , R^3 , R^X og R^Y , der er ens eller forskellige, er lige eller forgrenede alkylalkohol- eller alkyl-

0

Den foreliggende opfindelse angår et materiale til detektering af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve, hvilket materiale indeholder et organisk hydroperoxid og en indikator, der er i stand til at tilvejebringe et detekterbart respons i nærværelse af det peroxidativt aktive stof og peroxid. Opfindelsen angår desuden et testmiddel indeholdende det nævnte materiale samt en fremgangsmåde til fremstilling af testmidlet.

Der er i øjeblikket mange analytiske metoder tilgængelige til detektering af nærværelsen af peroxidativt aktive stoffer i biologiske prøver, f.eks. urin, fækale suspensioner og gastrointestinale bestanddele. Eksempelvis er hæmoglobin og derivater deraf, dvs. de analyter, der bestemmes ved konventionelle tests for okkult blod, typiske for peroxidativt aktive stoffer, eftersom de opfører sig på en måde, der minder om enzymet peroxidase. Som sådanne betegnes stofferne også pseudo-peroxidaser. Peroxidativt aktive stoffer er enzym-lignende på grund af deres katalyse af redox-reaktionen mellem peroxider eller hydroperoxider og sådanne indikatorforbindelser som benzidin, o-tolidin, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, 2,7-diaminofluoren og lignende forbindelser, idet de tilvejebringer et detekterbart respons, f.eks. en farveændring. De bedste metoder til bestemmelse af nærværelsen af okkult blod i testprøver beror således på denne pseudoperoxidaseaktivitet.

Der er blevet udviklet et antal analytiske metoder til bestemmelse af peroxidativt aktive stoffer, og disse metoder beror på den enzym-lignende katalyse af den peroxidative oxidation af farvedannende indikatorer. Primært omfatter disse metoder vådkemiske eller opløsnings-procedurer samt reagensbærende strimler af den såkaldte "dyp-og-aflæs"-type. Et typisk eksempel på de førstnævnte er angivet i R.M. Henry et al., Clinical Chemistry Principles and Techniques, 2. udg., 1124-1125 (Hagerstown, Maryland: Harper and Row, 1974). Denne som eksempel valgte procedure omfatter anvendelsen af iseddikesyre (puffer), diphenylamin (indikator) og hydrogenperoxid. Medens sådanne vådkemiske metoder har vist sig at

0

være analytisk anvendelige, har de dog mange ulemper, og to eksempler på sådanne ulemper er ringe reagensstabilitet og utilstrækkelig sensitivitet.

Ved en anden metode til bestemmelse af peroxidativt aktive stoffer, en metode, der i øjeblikket foretrækkes af de fleste kliniske analytikere, anvendes det såkaldte "dyp-og-aflæs"-reagensstrimmelmateriale. Et typisk sådant "dyp-og-aflæs"-materiale er et materiale, der er kommercielt tilgængeligt fra Ames Division of Miles Laboratories, Inc. under varemærket "Hemastix[®]". Dette materiale omfatter en porøs papirmatrix, der er imprægneret med en pufret blanding af et organisk hydroperoxid og en indikator, fastgjort til en plaststrimmel eller et håndtag. Ved neddykning af matrixen i en væske indeholdende hæmoglobin, myoglobin, erythrocyter eller andre peroxidativt aktive stoffer, dvs. pseudoperoxidaser, udvikles der en blå farve i matrixen, og denne farves intensitet er proportional med koncentrationen af stof i prøven. Ved sammenligning af den i matrixen udviklede farve med et standard-farvekort kan analytikeren på semikvantitativ basis bestemme mængden af analyt, der er til stede i prøven.

Fordelene ved sådanne reagensstrimler i forhold til vådkemiske metoder er primært følgende: 1) strimmelformatet er lettere at anvende, idet det hverken kræver fremstilling af reagenser eller hjælpeapparatur, og 2) der opnås større stabilitet af reagenser i strimlen, hvilket resulterer i forbedret nøjagtighed, sensitivitet og økonomi.

Hvadenten en bestemt analyse for et peroxidativt aktivt stof udføres ved den ene eller den anden af de ovenfor beskrevne metoder, eksisterer der et problem, der er fælles for begge: interferens forårsaget ved nærværelsen i prøven af reducerende midler i almindelighed og ascorbinsyre eller ascorbation i særdeleshed (herefter betegnet som ascorbat-interferens). Eksempelvis i tilfælde af urinalyse har den nylige popularitet af kost, der omfatter høje doser af vita-

0

min C (ascorbinsyre), resulteret i alvorlige ascorbat-interferensproblemer ved analyse for visse urinbestanddele, f.eks. okkult blod. Patienter, der indtager en sådan kost, udviser typisk forøgede niveauer af urin-ascorbat.

5

Så tidligt som i 1938 har man erkendt de uønskede virkninger af reducerende midler såsom ascorbat, jfr.

R. Kohn og R.M. Watrous, Journal of Biological Chemistry, 124, 163-168 (1938). Det samme problem optræder stadig i dette område af den diagnostiske analyse, hvilket fremgår

10

af et forslag fra 1979 gående ud på, at når der udføres en analyse for okkult blod (en pseudoperoxidase), bør der også udføres en samtidig ascorbat-analyse til måling af nøjagtigheden af bestemmelsen af det okkulte blod, jfr. L. Nielsen, P.J. Jørgensen og A.C. Hansen, Ugeskrift for Læger,

15

141, 791-793 (1979).

Mange forsøg på fjernelse af ascorbat-interferens i forbindelse med testsystemer, f.eks. systemer indeholdende glucose-sensitive reagenser, er rapporteret i litteraturen. Med hensyn til glucose-sensitive bestemmelser har forsøgene strakt sig fra udfiltrering af ascorbat, inden dette når frem til reagenserne, til anvendelsen af et enzym til sønderdeling deraf in situ.

20

I det canadiske patentskrift nr. 844.564 er der således beskrevet et materiale til glucosebestemmelse i urin eller andre medier, og dette materiale omfatter ud over en porøs del, der er imprægneret med normale glucose-responsive reagenser, en yderligere del til modtagelse af urin-testprøven. Den prøvemodtagende del omfatter et ionbyttermateriale, hvis eneste funktion i midlet er at adsorbere ascorbat, der måtte være til stede i urinprøven.

30

Ifølge USA-patentskrift nr. 4.168.205 er det blevet foreslået at inkorporere enzymet ascorbat-oxidase i testreagenspræparatet. Ethvert ascorbat, der er til stede i prøven, vil blive enzymatisk oxideret af ascorbat-oxidasen til dannelse af dehydroascorbat, der er en forbindelse, som ikke

35

0

uønsket påvirker den ønskede analyse.

Et andet forsøg på ophævelse af ascorbat-interferens fremgår af den japanske patentpublikation nr. 55757/1983.

5

Denne publikation beskriver anvendelsen af metalchelater af forskellige ligander såsom ethylendiamintetraeddikesyre og diethylentriaminpentaeddikesyre til forbehandling af en prøve, som dernæst anvendes til bestemmelse af kolesterol, glucose eller andre bestanddele såsom urinsyre.

10

I USA-patentskrift nr. 3.411.887 beskrives elimineringen af ascorbat-interferens med reagenssystemer, der er baseret på enzymatiske oxiderende stoffer, f.eks. glucose-oxidase, ved anvendelse af et ascorbat-opfangningssystem. Dette opfangningssystem omfatter en ioniserbar tungmetalforbindelse, der, når den er ioniseret, har et oxidations-reduktions-potentiale, der ligger mellem et redox-indikatorfarvestof og ascorbat. Nogle egnede metaller, der er anført som eksempler, omfatter cobalt, jern, kviksølv og nikkel.

20

I USA-patentskrift nr. 4.288.541 beskrives anvendelsen af mercuriion-komplekser, f.eks. mercuri-sarcosinat, til at meddele ascorbat-resistens til et glucose-glucoseoxidase-bestemmelsessystem.

25

Ud over det i det foregående angivne manifesterer interessen for ascorbat-problemet i forbindelse med glucose-tests sig i følgende litteratursteder:

1. H. Gifford et al., J. Amer. Med. Assoc., 178, 149-150 (1961).

2. P. O'Gorman et al., Brit. Med. J., 603-606 (1960).

30

3. R. Brandt et al., Clin. Chem. Acta, 51, 103-104 (1974).

4. R. Brandt et al., Am. J. Clin. Pathol., 68, 592-594 (1977).

På lignende måde som det forslag, der er angivet i det ovennævnte USA-patentskrift nr. 3.411.887, er der i an-

35

0

den litteratur tale om kompleksdannelse og oxidation af ascorbat under anvendelse af cobalt. Det rapporteres eksempelvis af G. Bragagnolo, Ann. Chim. Applicata, 31, 350-368, 1941, at opløsninger af ascorbinsyre oxideres med luft i nærværelse af cobaltmetal. En lignende aktivitet er også blevet
5 rapporteret med hensyn til $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ af Tomokichi Iwasaki i Journal of the Chemical Society of Japan, 63, 820-826 (1942).

Skønt den i det foregående angivne teknik i udstrakt
10 grad vedrører analytiske systemer til glucosebestemmelser, er der ikke fremsat nogen forslag med hensyn til løsningen af ascorbat-interferensproblemet i forbindelse med bestemmelsen af sådanne peroxidativt aktive stoffer som peroxidase og pseudoperoxidaser, f.eks. okkult blod (hæmoglobin). Uanset
15 angivelserne i det ovennævnte USA-patentskrift nr. 3.411.887 viser den førnævnte teknik, at metalioner, f.eks. $\text{Co}(\text{III})$, i virkeligheden også er pseudoperoxidaser. Eksempelvis anvendes $\text{Co}(\text{III})$ -acetat kommercielt til katalytisk sønderdeling af cumen-hydroperoxid, jfr. The Merck Index, 9. udg., 311
20 (1976). En række $\text{Co}(\text{III})$ -komplekser er blevet rapporteret katalytisk at sønderdele peroxider, jfr. K. Lohs, Monatsber. Deut. Akad. Wiss. Berlin, 8, 657-659 (1966), se også Chemical Abstracts, 67, 120383z, 1967. En fagmand ville derfor klart ledes til at mene, at anvendelsen af alle sådanne metalkomplekser i et typisk analytisk præparat til bestemmelse af
25 peroxidativt aktive stoffer, dvs. et præparat indeholdende et organisk hydroperoxid og en indikator, ville forårsage skadelig interaktion med hydroperoxidet, enten ved tilvejebringelse af "falske positive" resultater, eller på anden
30 måde ved at gøre det ikke-reaktivt over for det peroxidativt aktive stof, der er af interesse, f.eks. okkult blod, og dermed uanvendeligt til sådanne bestemmelser. Forsøg på at anvende mercuri-komplekser, f.eks. mercurisarcosinat, ved tests for okkult blod, er således slået fejl.

35

USA-patentskrift nr. 4.310.626 beskæftiger sig med

0 det foregående problem ved beskrivelse af anvendelsen af ammonium-Co(III)-komplekser til ophævelse af ascorbat-interferens med materialer til bestemmelse af peroxidativt aktive stoffer. Det nævnte patentskrift beskriver sådanne
5 materialer, der indeholder et organisk hydroperoxid og en egnet indikator, f.eks. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, sammen med ammonium-Co(III)-komplekser såsom bl.a. $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. Disse komplekser giver imidlertid ikke tilstrækkelig ascorbat-resistens til, at en test for okkult blod kan blive
10 kommercielt fordelagtig.

Andre forsøg på fjernelse af ascorbat-interferens ved analytiske bestemmelser af peroxidativt aktive stoffer omfatter eksempelvis det, der er angivet i det tyske patentskrift nr. 2.907.628. Dette tyske patentskrift omfatter
15 urinalyse i opløsning, idet en urinprøve forbehandles med en eller flere oxidanter til fjernelse af ascorbat, hvorpå der tilvejebringes kontakt med de anvendte analytiske reagenser. De beskrevne oxidanter er natriumiodat, natriumperiodat, calciumhydrochlorit, kaliumtriiodid, natriumhydrochlorit, chloramin og bromsuccinimid.
20

Sammenfattende kan det anføres, at forskellige forsøg på at ophæve eller formindske interferensproblemet, der frembydes af ascorbinsyre ved bestemmelse af peroxidativt aktive stoffer, har omfattet sådan teknik som anvendelsen af forskellige Co(III)-ammonium-komplekser, forbehandling af prøven med oxidationsmidler og direkte tilsætning til reagenssammensætningen af alkalimetaliiodater.
25

Pseudoperoxidaser såsom hæmoglobin studeres ofte som alternative peroxidasesystemer med henblik på at opnå viden
30 om virkningsmekanismen for naturlige peroxidaser, såsom de, der fås fra kilder som peberrod eller kartoffel. Ascorbinsyre har længe været kendt som et klassisk substrat for peroxidase, og ascorbinsyre-oxidation i nærværelse af metalchelater, der virker som pseudoperoxidaser, er et kendt fænomen. I 1967
35 og 1968 har M. Khan og A. Martell rapporteret vedrørende kine-

0 tiske studier af ascorbinsyre-oxidation i nærværelse af en
række ferri- og cupri-chelater over et pH-område fra 1,8
til 3,45, jfr. M. Khan og A. Martell, J. Am. Chem. Soc.,
89, 4176 (1967), J. Am. Chem. Soc., 89, 7104 (1967) og J.
5 Am. Chem. Soc., 90, 3386 (1968). En række forskellige kine-
tiske og thermodynamiske parametre blev undersøgt ved dis-
se studier. Resultatet var en rækkefølge for effektivitet
af forskellige chelater i overensstemmelse med deres evner
til oxidation af ascorbinsyre. Ud af fire aminopolycarboxyl-
10 syrer, der er blevet studeret af de nævnte forfattere, har
N-(2-hydroxyethyl)-ethylendiamintriæddikesyre (HEDTA)-chela-
tet af Fe^{3+} vist sig at være det hurtigste oxidationsmid-
del. Såvel Martell's arbejde som et tidligere studium af
Grinstead betragter denne ascorbinsyre-oxidations-aktivi-
15 tet som udgørende et "model"-peroxidasesystem, jfr. R.R.
Grinstead, J. Am. Chem. Soc., 82, 3464 (1960). Sådanne stu-
dier som det førnævnte studium af Grinstead udgør et forsøg
på at studere peroxidase-mekanismen ved hjælp af et bestemt
ferri-chelat, hvis struktur kan minde om strukturen for den
20 jernholdige hæg, der findes ved det aktive sted i enzymet
peroxidase. Forfatterne anvender faktisk betegnelsen "model-
peroxidasesystem" gentagne gange i deres værker. På grund
af den "model"-peroxidaseaktivitet, der udvises af dette
chelate og andre, der minder herom med hensyn til reaktivi-
25 tet, ville man imidlertid bestemt ikke forvente, at sådanne
stoffer kunne inkorporeres i organiske hydroperoxid-indika-
tor-systemer, såsom de, der nu typisk anvendes i analytiske
reagensmaterialer og -midler til bestemmelse af peroxidase
eller andre peroxidativt aktive stoffer. Endvidere har under-
30 søgelser, der er udført af Miles Inc. i forbindelse med
peroxidase-aktivitet, afsløret, at med indikatorer såsom
3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) eller o-tolidin (indika-
torer, der typisk anvendes i analytiske systemer til bestem-
melse af nærværelsen af peroxidativt aktive stoffer), kunne
35 sådan aktivitet forventes at forekomme omkring 200 gange hur-

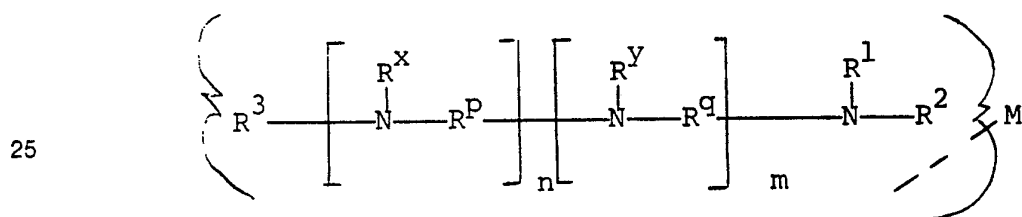
0 tigere end med ascorbinsyre, jfr. White-Stevens, R.H., Clin.
Chem., 28, 578 (1982). Det kan således antages, at såfremt
sådanne peroxidativt aktive metalchelater, "model"-peroxi-
daser, virker til i den grad let at oxidere ascorbinsyre,
5 en antagelse gjort af Khan, Martell og Grinstead, vil per-
oxidase-reaktionen med sådanne indikatorer som TMB forløbe
i det mindste med samme hastighed som ved ascorbinsyre, og
ikke omkring 200 gange hurtigere, som foreslået i forbindel-
se med disse senere studier, der blev udført med peberrods-
10 -peroxidase. Det er klart, at såfremt en yderst reaktiv ana-
lyt inkorporeres i selve det reagenspræparat, der skal æn-
dre farve i nærværelse af denne analyt, må det forventes, at
der vil opnås "falske positive" resultater.

 Til trods for de i det foregående beskrevne kendte
15 forslag har det nu vist sig, at visse peroxidativt aktive
metalchelater, især visse metalchelater af polycarboxyalkyl-
aminer, når disse anvendes på den her beskrevne måde, ikke
blot undlader at frembringe forventede "falske positive" re-
sultater i et præparat indeholdende et system af reagenser
20 til bestemmelse af peroxidativt aktive stoffer, men faktisk
er uventet fordelagtige i sådanne systemer med hensyn til
pålidelighed, stabilitet og sensitivitet af systemet over
for en analyt, der skal bestemmes. Det har endvidere vist
sig, at anvendelsen af de her omhandlede metalchelater er
25 særlig fordelagtig til overvindelse af de unøjagtigheder,
der kan forårsages ved interferens fra ascorbation, der er
til stede i en testprøve.

 Den foreliggende opfindelse er således baseret på den-
ne erkendelse, og som angivet ovenfor angår opfindelsen et
30 materiale til analytisk bestemmelse af peroxidativt aktive
stoffer, der er resistente mod ascorbatinterferens, især
bestemmelser, hvor der anvendes et materiale, der omfatter
et organisk hydroperoxid og en redox-indikator, f.eks. o-to-
lidin eller 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, samt et peroxi-
35 dativt aktivt metalchelater. Ved sådanne bestemmelser kataly-

serer eller på anden måde deltager den peroxidativt aktive analyt i en reaktion mellem indikatoren og det organiske hydroperoxid, fordi analytten imiterer enzymet peroxidase. Reaktionen giver en farve eller et andet detekterbart respons, hvis intensitet indikerer koncentrationen af analytten. Når ascorbation er til stede, forårsager dette et alvorligt interferensproblem. Nærværelsen af et peroxidativt aktivt metalchelat i materialet måtte altså forventes at interferere med den analytiske bestemmelse af en peroxidativt aktiv analyt. Ikke desto mindre har det vist sig, at hidtil ukendte materialer, testmidler og testorganer, der er resistente mod de interfererende virkninger af ascorbinsyre i en prøve, kan fremstilles med held til detektering af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i prøven, og disse materialer, testmidler og testorganer omfatter metalchelater af polycarboxyalkylamin-derivater, der også kendes som "model-peroxidaser".

Materialet ifølge opfindelsen, der er af den allerede angivne art, er således ejendommeligt ved, at det yderligere omfatter et metalchelat af et polycarboxyalkylamin-derivat med den almene formel



i hvilken

(a) R^1 betyder hydrogen eller ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, R^2 , R^3 , R^X og R^Y , der er ens eller forskellige, er ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, idet mindst to af substituenterne R^1 , R^2 , R^3 , R^X eller R^Y er alkylcarboxylsyre-grupper som defineret ovenfor,

(b) R^P og R^Q , der er ens eller forskellige, er lige-kædede eller forgrenede alkylengrupper med fra 1-3 carbon-atomer eller divalente 1,2-cycloaliphatiske grupper med fra 6-9 carbonatomer,

5 (c) n er et helt tal med en værdi fra 0 til 1, m er et helt tal med en værdi fra 0 til 2, idet såfremt m er 2, 2 R^Q -grupper kan være ens eller forskellige, og

(d) M betyder Fe^{+3} .

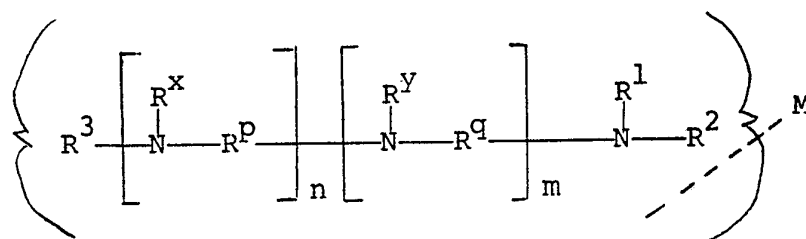
Foretrukne forbindelser er de, hvor m er 0, n er 1,
10 og R^P er en ethylengruppe. Særligt foretrukne er metalchelaterne af polycarboxyalkylamin-derivater, i hvilke alkyl-carboxylsyre-grupperne er $-CH_2COOH$.

Et foretrukket metalchelat er et ferrichelat af N-(2-hydroxyethyl)-ethylendiamintrieddikesyre (Fe-HEDTA).

15 I en foretrukken udførelsesform for opfindelsen inkorporeres materialet i en bærematrix, f.eks. et sugende papir, til dannelselse af et testmiddel, der kan fastgøres til en indifferent understøtning til dannelselse af et testorgan, og opfindelsen angår således også et testmiddel til bestem-
20 melse af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve, og dette middel er ejendommeligt ved, at det omfatter en bærer-matrix, hvori der er inkorporeret et materiale ifølge opfindelsen som ovenfor defineret. Desuden tilvejebringes der med den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til frem-
25 stilling af testmidlet.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af et testmiddel til bestemmelse af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve, hvor testmidlet er resistent mod interfererende virkninger af ascorbat, der
30 kan være til stede i prøven, er ejendommelig ved, at denne fremgangsmåde omfatter følgende trin:

a) fremstilling af en første reagensopløsning indeholdende et organisk hydroperoxid og et metalchelat af et polycarboxyalkylamin-derivat med den almene formel



5

i hvilken

(i) R^1 betyder hydrogen eller ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, R^2 , R^3 , R^X og R^Y , der er ens eller forskellige, er ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, idet mindst to af substituenterne R^1 , R^2 , R^3 , R^X eller R^Y er alkylcarboxylsyre-grupper som defineret ovenfor,

(ii) R^P og R^Q , der er ens eller forskellige, er ligekædede eller forgrenede alkylengrupper med fra 1-3 carbonatomer eller divalente 1,2-cycloaliphatiske grupper med fra 6-9 carbonatomer,

(iii) n er et helt tal med en værdi fra 0 til 1, m er et helt tal med en værdi fra 0 til 2, idet såfremt m er 2, 2 R^Q -grupper kan være ens eller forskellige, og

(iv) M betyder Fe^{+3} ,

b) inkorporering af den første reagensopløsning i en bærermatrix ved fugtning af matrixen med den første opløsning,

c) tørring af den fugtede matrix til efterladelse af en remanens af metalchelatatet og hydroperoxidet,

d) fremstilling af en anden reagensopløsning indeholdende en indikator og et opløsningsmiddel, idet indikatoren er i stand til at tilvejebringe et detekterbart respons i nærværelse af et peroxid og det peroxidativt aktive stof,

e) inkorporering af den anden reagensopløsning i den tørrede bærermatrix ved fugtning af matrixen med den anden reagensopløsning, og

f) tørring af matrixen til efterladelse af en kombineret remanens indeholdende metalchelatatet, hydroperoxidet og indikatoren.

Anvendelse af et metalchelat ifølge opfindelsen medfører, at materialerne og testmidlet ikke blot får en fortrinlig resistens mod ascorbat-interferens, men også en uventet fordelagtig stabilitet, hvilket genspejles i eksperimentelle resultater med hensyn til god opbevaringsstabilitet og stabilitet ved forhøjede temperaturer samt undgåelse af "falske positive" resultater.

Indledende vådkemiske forsøg udført under udviklingen af den foreliggende opfindelse, og ved hvilke der anvendes kun ferrichelatet af N-2-(hydroxyethyl)-ethylendiamin-trieddikesyre (her betegnet Fe-HEDTA, idet denne betegnelse anvendes af bekvemmelighedsgrunde og ikke skal antyde noget om eksistensen af en covalent binding mellem metalionen og polycarboxyalkylamin-derivatet), ascorbinsyre og puffer, bekræftede hurtigheden af ascorbinsyre-oxidationen i nærværelse af dette chelat, et resultat, der kunne forventes ud fra de tidligere nævnte rapporter fra Khan og Martell. I betragtning af, hvor meget hurtigere TMB har vist sig at blive oxideret i peroxidaseholdige materialer, sammenlignet med ascorbinsyre-oxidation med sådanne materialer, forventedes det således, at et materiale, der indeholder et organisk hydroperoxid, en oxiderbar indikator såsom TMB samt yderligere et sådant metalchelate, ville være yderst ustabil og hurtigt give "falske positive" resultater.

Ved yderligere forsøg har det imidlertid vist sig, at der kan fremstilles et materiale, der omfatter sådanne metalchelater, og som er egnet til detektering af peroxidativt aktivt stof, og endvidere kan tilpasses en tør, fast tilstand, idet materialet udviser god reagensstabilitet under fremstillingen og ved opbevaring samt undgåelse af "falske positive" resultater, ved kontakt med kendt hæmoglobin-negativ urin. Dette resultat som opnået med den foreliggende opfindelse står i modsætning til ethvert forslag i den kendte teknik, der som tidligere diskuteret foreslår, at metalchelater såsom Fe-HEDTA kan anvendes som "model-peroxidaser", og således ville være uegnede til anvendelse i et materiale til bestemmelse af koncentrationen af en peroxidativt aktiv analyt.

Testmidler til detektering af okkult blod (OB), dvs. hæmoglobin, i biologiske væsker såsom urin, der er fremstillet ud fra det hidtil ukendte materiale ifølge opfindelsen, har vist sig at være resistente mod unormalt forhøjede ascorbinsyre-niveauer i urin. Som tidligere diskuteret er inhibering på grund af ascorbinsyre et alvorligt problem, navnlig i betragtning af den kendsgerning, at omkring 25% af urinprøver kan forventes at udvise ascorbinsyre-niveauer, der er højere end 10 mg pr. dl (mg/dl). Konventionelle OB-
midler eller -organer, der ikke omfatter et ascorbat-interferens-retarderende middel af en eller anden art, viser sig sædvanligvis at blive inhiberet, dvs. gjort mindre følsomme over for nærværelsen af hæmoglobin, ved ascorbinsyrekoncentrationer så lave som 5 mg/dl. Midler, der fremstilles ifølge den foreliggende opfindelse, er imidlertid i høj grad fordelagtige med hensyn til ascorbat-interferens-resistens, i forhold til sådanne konventionelle midler og organer, idet midlerne ifølge opfindelsen muliggør detektering af peroxidativt aktive stoffer i væsker, der indeholder
forholdsvis høje niveauer af ascorbinsyre, f.eks. af størrelsesordenen 50 mg/dl.

Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes der således et materiale og et testmiddel til bestemmelse af peroxidativt aktive stoffer i biologiske væsker såsom urin. Ud over hæmoglobin kan der også detekteres andre peroxidativt aktive stoffer ved hjælp af de her omhandlede materialer og midler, herunder f.eks. peroxidase, myoglobin, erythrocyter og andre pseudoperoxidaser. Opfindelsen involverer anvendelsen af et metalchelate, der er et derivat af en polycarboxyalkylamin, og som også kendes som en "model-peroxidase", med det formål at reducere eller eliminere de ødelæggende og uønskede virkninger af ascorbinsyre på analytiske bestemmelser udført på biologiske væsker. I denne henseende virker metalchelatatet således, at det letter oxidationen af ascorbationer, der kan være til stede i sådanne væsker.

0

Materialet og testmidlet ifølge opfindelsen har vist sig at være væsentligt mindre udsat for ascorbat-interferens, og at give et respons, der er visuelt eller instrumentalt detekterbart, f.eks. et farverespons, på nærværelsen af spor-hæmoglobinniveauer af størrelsesordenen 0,03 mg/dl eller endog mindre.

5

10

15

20

Det organiske hydroperoxid, der skal anvendes i materialet ifølge opfindelsen, kan udvælges blandt mange velkendte organiske hydroperoxider. Et udvalgt hydroperoxid skal imidlertid være i stand til at reagere med et peroxidativt aktivt stof i nærværelse af en indikator til frembringelse af et detekterbart respons, f.eks. en farveændring eller en ændring i den mængde lys, der absorberes eller reflekteres af testmaterialet. Blandt hydroperoxider, der er særligt egnede, kan nævnes cumen-hydroperoxid, tert.butyl-hydroperoxid, diisopropylbenzen-hydroperoxid, 2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid, paramenthan-hydroperoxid samt andre velkendte hydroperoxider, der er egnede til oxidation af den anvendte indikator, eller blandinger af disse forbindelser. Blandt de ovennævnte hydroperoxider er cumen-hydroperoxid det mest foretrukne.

25

30

Mange indikatorer er egnede til anvendelse i det her omhandlede materiale, blot de er i stand til ved interaktion at frembringe et detekterbart respons i nærværelse af et organisk hydroperoxid og et peroxidativt aktivt stof. Disse indikatorer omfatter eksempelvis forbindelserne af den såkaldte "benzidin-type", benzidin, o-tolidin, 3,3',5,5'-tetra-(lavere alkyl)-benzidin, 2,7-diaminofluoren og blandinger af disse forbindelser og forskellige andre. Betegnelsen "lavere alkyl" henviser til en alkylgruppe med fra 1 til 6 carbonatomer, herunder methyl, ethyl, n-propyl og isopropyl, og de forskellige butyl-, pentyl- og hexyl-isomere. Indikatoren 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) er særlig foretrukket.

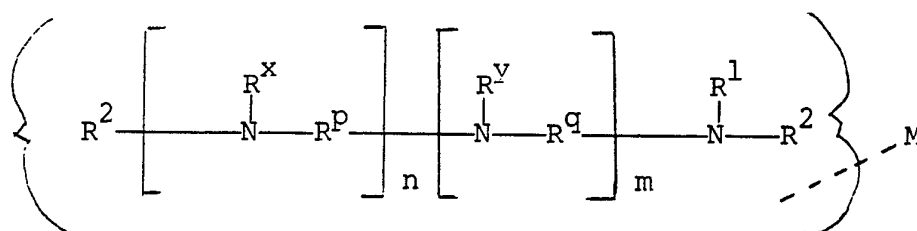
35

Egnetheden af et bestemt metalchelat, der udvælges til anvendelse, bestemmes ikke blot af dets evne til at

0

lette oxidationen af ascorbinsyre, men også af dets foren-
 lighed med de andre bestanddele af materialet. Sådanne eg-
 nede chelater har således vist sig at omfatte metalchela-
 ter af polycarboxyalkylamin-derivater, der kan repræsente-
 5 res ved den almene formel:

10



Eksempler på metalchelater, der har vist sig egnede
 til anvendelse i forbindelse med den foreliggende opfindel-
 15 se, omfatter således ferri-chelaterne af N-(2-hydroxyethyl)-
 -ethylendiamintrieddikesyre (Fe-HEDTA), ethylendiamintetra-
 eddikesyre (Fe-EDTA), cyclohexylendiamintetraeddikesyre (Fe-
 -CDTA), nitrilotrieddikesyre (Fe-NTA), iminodieddikesyre
 (Fe-IMDA), ethylendiamindieddikesyre-dipropionsyre (Fe-EDDP),
 20 både α - og β -former, samt hydroxyethyliminodieddikesyre (Fe-
 -HIMDA) og blandinger deraf. Ferrichelat-formerne foretræk-
 kes almindeligvis, og mest foretrukne er forbindelserne Fe-
 -HEDTA og Fe-EDTA, idet Fe-HEDTA navnlig foretrækkes. Ud
 over de her specifikt angivne chelater kan der imidlertid
 25 ifølge opfindelsen anvendes mange andre egnede chelater,
 hvilket vil være åbenbart for en fagmand med kendskab til
 det foregående.

Det har således vist sig eksperimentelt, at Fe-HEDTA
 og Fe-EDTA, især Fe-HEDTA, giver fortrinlige resultater i
 30 det her omhandlede materiale og testmiddel, idet der på sær-
 deles tilfredsstillende måde tilvejebringes ascorbinsyre-
 -interferens-resistens ved tests for okkult blod (hvilket
 muliggør detektering af hæmoglobin), idet der tilvejebrin-
 ges god reagensstabilitet inden anvendelsen og undgåelse
 35 af "falske positive" resultater. Endvidere vil andre her
 angivne metalchelate-forbindelser samt adskillige andre

0

virke tilfredsstillende. Væsentlige variationer i den hastighed, med hvilket et peroxidativt aktivt stof kan detekteres, når der anvendes sådanne andre forbindelser, kan imidlertid forventes på grund af varierende hastigheder for ascorbat-oxidation. Det vil således forstås, at egnede metalchelater til anvendelse i forbindelse med den foreliggende opfindelsen kan udvælges fra vilkårlige sådanne, der er polycarboxyalkylamin-derivater inden for den klasse af forbindelser, der tidligere er beskrevet, og at alle sådanne forbindelser kan forventes på tilfredsstillende måde at muliggøre oxidation af ascorbat, hvilket betyder, at disse forbindelser falder inden for opfindelsens rammer. Mange forbindelser vil dog i denne henseende virke langsomt og er således mindre praktisk egnede til kommerciel anvendelse og foretrækkes ikke.

15

Egnede metalchelater til anvendelse i forbindelse med opfindelsen kan fremstilles ved konventionelle laboratoriemetoder under anvendelse af polycarboxyalkylamin-derivater, der er kommercielt tilgængelige fra eksempelvis Aldrich Chemical Co., Sigma Chemical Company eller andre leverandører. Eksempelvis kan metalchelatat Fe-HEDTA fremstilles ved blanding af ækvimolære mængder af kommercielt tilgængelig HEDTA og $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i vandig opløsning til tilvejebringelse af en 1:1 (mol:mol) Fe-HEDTA-opløsning af jern:chelatat. Andre opløsningskoncentrationsforhold mellem metal og chelat kan let fremstilles ved variation af de respektive koncentrationer af de sammenblandede opløsninger. Det har vist sig, at de bedste resultater med hensyn til overvindelse af ascorbat-interferens opnås, når koncentrationen af metalion i forhold til polycarboxyalkylamin-derivat i chelatet er ca. 1:1 (mol: mol).

30

Et foretrukket koncentrationsområde for et givet metalchelatat vil variere betydeligt ved forskellige udførelsesformer for opfindelsen. Eksempelvis i tilfælde af Fe-HEDTA ligger et foretrukket koncentrationsområde i øjeblikket fra ca. 0,5 millimolar (mM) til ca. 50 mM, når det anvendes i et

35

0

materiale indeholdende et organisk hydroperoxid og en tetra-
-(lavere alkyl)-benzidin-indikator. Dette område er blevet
bestemt som det optimale til opnåelse af resistens op til ca.
et ascorbat-koncentrationsniveau på 50 mg/dl i urinprøver.

5 Det har ved forsøg endvidere vist sig, at lavere koncentra-
tioner af nogle egnede ferrichelater muliggør forholdsvis
hurtig hæmoglobindetektering, medens højere koncentrationer
af de samme chelater eller af andre chelater var mindre ef-
fektive. Disse tilsyneladende unormale resultater er nærmere
10 angivet i det følgende og viser den manglende generelle sam-
menhæng mellem chelatkoncentration og funktionalitet eller
egnethed i det her omhandlede materiale.

Det har eksperimentelt vist sig, at hovedparten af
egnede metalchelater, der virker tilfredsstillende i det
15 her omhandlede materiale, strukturelt har en alkylamin- el-
ler en amin-centralgruppe, samt carboxylsyre-radikalet
-CH₂COOH. Andre chelater, der ikke har sådanne karakteri-
stika, men som falder inden for det generelle omfang for
forbindelserne, der tidligere er angivet, kan imidlertid
20 generelt være effektive til overvindelse af ascorbat-inter-
ferens og tilvejebringelse af tilfredsstillende sensitivitet
og stabilitet, og disse er derfor tilfredsstillende til an-
vendelse.

Det vil forstås, at ved anvendelsen vil ydeevnen af
25 en bestemt udførelsesform for et materiale eller et test-
middel, der er baseret på den generelle opfindelsestanke,
afhænge af mange forskellige faktorer. Eftersom en typisk
urinprøve fra et menneske, der er vænnet til indtagelse af
store mængder ascorbinsyre (vitamin C), ofte indeholder
30 fra 25-100 mg/dl ascorbat eller mere, er et reference-as-
corbatniveau til researchformål blevet valgt til ca. 50
mg/dl. Foretrukne udførelsesformer for det ascorbat-resi-
stente materiale og testmidlet ifølge opfindelsen har vist
sig at muliggøre detektering af peroxidativt aktive stoffer
35 i sådanne prøver, ikke blot ved referenceniveauet på ca.
50 mg/dl, men også ved forskellige andre ascorbat-niveau-

0

er. I de fleste tilfælde kan der forekomme en forlænget tid for respons med ascorbat-niveauer, der er meget større end chelat-koncentrationsniveauet. Som det fremgår af det følgende, har "forsinkelsestider", dvs. den tid, der forløber, indtil der fremkommer et iagttageligt respons, eksperimentelt vist sig at ligge i området fra mindre end 1/3 minut til ca. 1/2 time, for foretrukne udførelsesformer for opfindelsen med forskellige chelat-koncentrationsniveauer, der er afprøvet for deres evne til detektering af hæmoglobin i urin i nærværelse af et niveau på 50 mg/dl af ascorbat.

I en foretrukken udførelsesform anvendes materialet ifølge opfindelsen til fremstilling af et testmiddel til bestemmelse af et peroxidativt aktivt stof. I en sådan foretrukken udførelsesform kan materialet inkorporeres i en egnet bærermatrix til dannelselse af et testorgan. Bærermatrixen kan have mange former, f.eks. de, der er beskrevet i USA-patentskrift nr. 3.846.247 (filt, porøse keramiske strimler og vævede eller matterede glasfibre). Også egnede er de matrixer, der er beskrevet i USA-patentskrift nr. 3.552.928 (træstrimler, stof, svampemateriale og leragtige stoffer). Anvendelsen af syntetiske harpiksflor og glasfiberfilt som bærematrixer er foreslået i det britiske patentskrift nr. 1.369.139. Ifølge et andet britisk patent, nr. 1.349.623, foreslås anvendelsen af lyspermeable netværk af tynde filamenter som et overtræk for en underliggende papi matrix. Polyamidfibre er beskrevet i det franske patentskrift nr. 2.170.397. Til trods for disse angivelser er de materialer, der konventionelt anvendes som bærematrixer, og som er særligt foretrukne og egnede til anvendelse i forbindelse med den foreliggende opfindelse, sugende materialer såsom filterpapir og lignende. Det må imidlertid bemærkes, at bærematrixen kan have forskellige fysiske former som ovenfor angivet, samt andre former, og at alle sådanne former er egnede og kan anvendes i forbindelse med nærværende opfindelse.

0

Ved fremstillingen af testmaterialet ifølge opfindelsen kan materialets bestanddele inkorporeres i bærematrixen på en række forskellige måder. Eksempelvis kan bestanddelene opløses eller suspenderes i vand eller et andet egnet opløsningsmiddel, fortrinsvis et organisk opløsningsmiddel såsom ethanol, acetone eller dimethylformamid (DMF), samt blandinger af disse opløsningsmidler og andre. Opløsningen eller suspensionen kan derpå anvendes til imprægnering af sugende filtrerpapir, f.eks. i form af en sværte, i hvilken reagenserne trykkes på en egnet matrix. Alternativt kan bærematrixen neddyppes i eller overtrækkes med materialet, f.eks. med en rakel.

Den i øjeblikket foretrukne metode til inkorporering af bestanddelene af materialet i bærematrixen består i imprægnering af sugende filtrerpapir med to eller flere opløsninger eller suspensioner af bestanddelene. Imprægneringen opnås således ved neddykning af et stykke filtrerpapir to eller flere gange i sådanne opløsninger eller suspensioner, hvorpå det neddyppede papir tørres i en ovn efter hver neddykning. De således tildannede testmidler lamineres dernæst til den ene side af et stykke dobbeltsidet adhæsivt tape, laminatet skæres i strimler, og hver strimmel forbindes til et aflangt ark af bagklædningsmateriale af plast, f.eks. polystyren, som dernæst opskæres parallelt med dets korte dimension til dennelse af aflange organer med det imprægnerede papir ved den ene ende, idet den anden ende tjener som et håndgreb. Det således fremstillede testorgan består således af et stykke af det dobbelt tørrede og imprægnerede testmateriale, der ved den ene ende er fastgjort til en plan side af en aflang plastunderstøtning, som dernæst udgør et bekvemt håndgreb.

En foretrukken metode til fremstilling af testmidlet ifølge opfindelsen består eksempelvis i, at Fe-HEDTA indføres i filtrerpapiret sammen med det organiske hydroperoxid, men inden tilsætningen af indikatoren, ved en vandig første neddykning. Filtrerpapiret kan således først imprægneres med

0

en vandig opløsning af Fe-HEDTA og hydroperoxidet, sammen med et eller flere egnede opløsningsmidler og/eller puffere, f.eks. triethanolamin-borat og tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-malonat (her betegnet TRIS-malonat), tørres, genimprægneres i en anden neddypningsopløsning af indikatoren i et
5 egnet opløsningsmiddel, f.eks. ethanol, og tørres en yderligere gang. En sådan proces med to neddypninger, hvor metalchelatatet først imprægneres i papiret inden de andre aktive reagenser, har vist sig sig at give et testmiddel, der ud-
10 viser fortrinlig ascorbat-resistens og opbevaringsstabilitet.

En specielt foretrukken metode til fremstilling af testmidlet ifølge opfindelsen består i at indføre metalchelatatet og reagenserne, bortset fra indikatoren, i filtrerpapiret ved neddykning deraf i en første opløsning af reagenserne som tidligere beskrevet, hvorefter man tørrer papiret og derpå tilsætter indikatoren ved neddykning af det tørrede papir i en opløsning af indikatoren og et fortykkelsesmiddel, f.eks. polyvinylpyrrolidon, i et egnet opløsningsmiddel, efterfulgt af en yderligere tørring.
20

Ud over de i det foregående beskrevne testmateriale-reagenser og andre bestanddele kan der inkluderes yderligere bestanddele, f.eks. forskellige fortykkelsesmidler, fugtemidler, pufferstoffer, emulgeringsmidler og velkendte til-sætningsstoffer, i det her omhandlede materiale og det her
25 omhandlede testmiddel. Eksempelvis kan der som fortykkelsesmidler anvendes forskellige materialer ud over eller i stedet for polyvinylpyrrolidon, f.eks. gelatine, algin, carrageenin, casein, albumin, methylcellulose og lignende. Som
30 fugtemiddel er det foretrukket at anvende natriumdodecylsulfat, men der kan også anvendes ethvert langkædet organisk sulfat eller sulfonat, f.eks. dioctylnatriumsulfosuccinat eller natriumdodecylbenzensulfonat. I puffersystemerne kan der udover triethanolaminborat og TRIS-malonat anvendes tartrat,

35

0

phosphat, phthalat, citrat, acetat, succinat eller andre puffere. Fortrinsvis pufres materialerne til en pH-værdi på fra ca. 6,0 til ca. 7,0. Som emulgeringsmidler kan der eksempelvis anvendes polyvinylalkohol, gummi arabicum eller
5 carboxyvinylpolymere. De organiske opløsningsmidler, der kan anvendes til suspendering af indikatoren, omfatter de fleste ikke-reaktive, organiske, flygtige opløsningsmidler såsom ethanol, acetone, DMF, chloroform, ethylendichlorid, benzen og ethylacetat. Naturligvis er valget af andre egne-
10 de opløsningsmidler uden videre muligt for en fagmand på det foreliggende område.

Ved anvendelsen kan testmidlet neddyppes i en væske-suspension af det materiale, der skal testes, og dernæst øjeblikkeligt fjernes igen. Alternativt kan prøven, på fly-
15 dende, fast eller halvfast form, påføres på testmidlet. I nærværelse af et peroxidativt aktivt stof i prøven frembringer testmaterialet en farveændring eller et andet detekterbart respons. Såfremt det nævnte respons er en farve, kan denne sammenlignes med i forvejen kalibrerede farvestandarder til
20 bedømmelse af den kvantitative mængde af peroxidativt aktivt stof, der er indeholdt i prøven. Intakte peroxidativt aktive stoffer, f.eks. intakte røde blodlegemer, kan vise sig som prikker eller pletter af farve på den i øvrigt ufarvede ma-
trix. Hæmolyserede peroxidativt aktive stoffer kan på ens-
25 artet måde farve matrixen. Udover visuel sammenligning kan der også anvendes forskellige instrumentmetoder til bestemmelse af kvaliteten af farven eller et andet frembragt re-
spons, hvorved man forøger nøjagtigheden af testen ved und-
gåelse af den subjektive bestemmelse ved hjælp af det men-
30 neskelige øje.

De følgende eksempler tjener til nærmere illustration af opfindelsen og dennes fordele.

0

Eksempler

A. Testmaterialet

5 Eksempel 1 -- Fe-HEDTA

Der gennemføres et forsøg, hvor materialet ifølge opfindelsen, der kan anvendes til bestemmelse af nærværelsen af peroxidase eller et andet peroxidativt aktivt stof i en testprøve, især hæmoglobin, fremstilles. Materialet omfatter, som et ascorbat-interferens-retarderende middel, et 1:1 (mol til mol angivet som M:M)-ferrichelat af N-(2-hydroxyethyl)-ethylendiamintriethyldikesyre (Fe-HEDTA). Fe-HEDTA-chelatet fremstilles ved opløsning af 0,278 g HEDTA i 100 ml destilleret vand til dannelse af en 10 mM HEDTA-opløsning, hvorpå der opløses 0,270 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i den 10 mM HEDTA-opløsning. Ascorbinsyre i en koncentration på 5 mM sættes til materialet i en mængde, der er tilstrækkelig til at frembringe et koncentrationsniveau på 50 μM i det endelige rumfang af opløsningen. Bestanddelen af materialet og ascorbinsyren kombineres i den rækkefølge og i de mængder, der er angivet i den følgende tabel. Opløsningen af det endelige materiale indeholder en 100 μM koncentration af Fe-HEDTA, hvilket er et koncentrationsniveau, der ligesom niveauet for de andre tilstedeværende bestanddele er væsentligt mindre end det, der skulle anvendes i et tilsvarende materiale ifølge opfindelsen til inkorporering i et testmiddel i fast tilstand.

	0,2 molær (M) natriumcitrat-puffer	9,5 ml
30	10 mM Fe-HEDTA	0,1 ml
	10 g/dl [*] natriumdodecylsulfat	0,1 ml
	1 M cumen-hydroperoxid	0,1 ml
	10 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin	0,1 ml
	5 mM ascorbinsyre	0,1 ml
35	[*] gram pr. deciliter	

0

Det således fremstillede materiale ifølge opfindelsen iagttages at danne en blå farve, når en vandig blodaliquot tilsættes til dannelsen af en slutkoncentration på 0,139 mg hæmoglobin pr. dl i opløsningen, hvilket viser materialets evne til detektering af tilstedeværende hæmoglobin til trods for prøvens niveau af ascorbat på 50 μ M.

Eksempel 2 -- Fe-EDTA

Forsøget fra eksempel 1 gentages med den undtagelse, at der anvendes 10 mM af ferrichelatet af ethylendiamintetraeddikesyre (Fe-EDTA) i opløsning i stedet for Fe-HEDTA. Fe-EDTA fremstilles i det væsentlige som beskrevet i eksempel 1 ved opløsning af 0,292 g EDTA i 100 ml destilleret vand og tilsætning af $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ som beskrevet i eksempel 1. Det således fremstillede materiale danner, som i eksempel 1, en blå farve i nærværelse af 0,139 mg hæmoglobin pr. dl og 50 μ M ascorbat.

Eksempel 3 -- Fe-CDTA

Forsøget fra eksempel 1 gentages med den undtagelse, at der anvendes 10 mM af ferrichelatet af cyclohexylendiamintetraeddikesyre (Fe-CDTA) i opløsning i stedet for Fe-HEDTA. Fe-CDTA-opløsningen fremstilles ved opløsning af 0,346 g CDTA i 100 ml destilleret vand og tilsætning af $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ som beskrevet i eksempel 1. Det således fremstillede materiale danner ligesom i eksempel 1 en blå farve i nærværelse af 0,139 mg hæmoglobin pr. dl og 50 μ M ascorbat.

Eksempel 4 -- Fe-IMDA

Forsøget fra eksempel 1 gentages med den undtagelse, at der anvendes 10 mM af ferrichelatet af iminodieddikesyre (Fe-IMDA) i opløsning i stedet for Fe-HEDTA. Fe-IMDA-opløsningen fremstilles ved opløsning af 0,133 g IMDA i 100 ml destilleret vand og tilsætning af $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ som beskrevet i eksempel 1. Det således dannede materiale frembringer ligesom i eksempel 1 en blå farve i nærværelse af 0,139 mg hæmoglobin pr. dl og 50 μ M ascorbat.

0

Eksempel 5 -- Fe-NTA

Forsøget fra eksempel 1 gentages med den undtagelse, at der anvendes 10 mM af ferrichelatet af nitrilotrieddikesyre (Fe-NTA) i opløsning i stedet for Fe-HEDTA. Fe-NTA-op-
5 løsnings fremstilles ved opløsning af 0,191 g NTA i 100 ml destilleret vand og tilsætning af $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ som beskrevet i eksempel 1. Det således fremstillede materiale danner ligesom i eksempel 1 en blå farve i nærværelse af 0,139 mg hæmo-
globin pr. dl og 50 μM ascorbat.

10

Eksempel 6 -- Fe-EDDP _{α}

Forsøget fra eksempel 1 gentages med den undtagelse, at der anvendes 10 mM af ferrichelatet af α -ethylendiamindieddikesyre-dipropionsyre (Fe-EDDP _{α}) i opløsning i stedet for
15 Fe-HEDTA. Fe-EDDP _{α} -opløsningen fremstilles ved opløsning af 0,320 g EDDP _{α} i 100 ml destilleret vand, hvorpå der tilsættes $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ som beskrevet i eksempel 1. Det således fremstillede materiale danner en blå farve ligesom i eksempel 1 i nærværelse af 0,139 mg hæmoglobin pr. dl og 50 μM ascorbat.

20

Eksempel 7 -- Fe-EDDP _{β}

Forsøget fra eksempel 1 gentages med den undtagelse, at der anvendes 10 mM af ferrichelatet af β -ethylendiamindieddikesyre-dipropionsyre (Fe-EDDP _{β}) i opløsning i stedet for
25 Fe-HEDTA. Fe-EDDP _{β} -opløsningen fremstilles ved opløsning af 0,320 g EDDP _{β} i 100 ml destilleret vand, hvorpå der tilsættes $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ som beskrevet i eksempel 1. Det således fremstillede materiale danner ligesom i eksempel 1 en blå farve i nærværelse af 0,139 mg hæmoglobin pr. dl og 50 μM ascorbat.

30

Eksempel 8 -- Fe-HIMDA

Forsøget fra eksempel 1 gentages med den undtagelse, at der anvendes 10 mM af ferrichelatet af hydroxyethylimino-
dieddikesyre (Fe-HIMDA) i opløsning i stedet for Fe-HEDTA.
35 Fe-HIMDA-opløsningen fremstilles ved opløsning af 0,177 g

0 HIMDA i 100 ml destilleret vand, hvorpå der tilsættes
FeCl₃·6H₂O som beskrevet i eksempel 1. Det således frem-
stillede materiale danner en blå farve ligesom i eksempel 1
i nærværelse af 0,139 mg hæmoglobin pr. dl og 50 µM ascor-
5 bat.

Eksempel 9-16

Der udføres forsøg i det væsentlige som beskrevet i
de foregående eksempler 1-8 til fremstilling af materialer
10 ifølge opfindelsen, men med den undtagelse, at der i hvert
enkelt tilfælde anvendes 9,4 ml 0,2 M natriumcitratpuffer
i stedet for 9,5 ml, og at der anvendes 0,2 ml af hvert fer-
richelat i stedet for 0,1 ml. Dette gør det muligt, at der
kan være en koncentration af ferrichelat på 200 µM til ste-
15 de i hvert materiale. I hvert enkelt tilfælde iagttages ma-
terialet indeholdende 200 µM ferrichelat, når det testes
som tidligere beskrevet, at danne blå farver i nærværelse
af 0,139 mg hæmoglobin pr. dl og 50 µM ascorbat, hvilket
viser en evne til detektering af hæmoglobin til trods for
20 nærværelsen af ascorbat i prøven. Der iagttages imidlertid
forskelle mellem de tider, der kræves til farvedannelsen,
ved sammenligning med de farvedannelsestider, der iagttages,
når man på tilsvarende måde tester ferrichelat-materialerne
med 100 µM i eksemplerne 1-8. Farvedannelsestiderne i hvert
25 enkelt tilfælde, der betegnes som "forsinkelsestider", er
angivet i den følgende tabel og viser, at der som tidlige-
re beskrevet ikke synes at være noget generelt forhold el-
ler nogen generel korrelation mellem koncentrationen af me-
talchelate, f.eks. et af de i det foregående nævnte ferri-
30 -komplekser, som anvendes i et materiale ifølge opfindel-
sen, og materialets evne til at modvirke ascorbat-interfe-
rens og tillade detektering af et peroxidativt aktivt stof.

Forsøgsresultater:
farvedannelse, forsinkelsestid
(50 μ M ascorbat)

Eksempel nr.	Metalchelatat:		Metalchelatat-koncentration	
	1:1 (M:M)	Fe ³⁺ -chelatat	100 μ M	200 μ M
			Eksempel 1-8	Eksempel 9-12
1 og 9	Fe ³⁺	- HEDTA	18 sek.	ikke udført
2 og 10	Fe ³⁺	- EDTA	67 sek.	ikke udført
3 og 11	Fe ³⁺	- CDTA	3 min.	2 1/2 min.
4 og 12	Fe ³⁺	- IMDA	5 min.	7 min.
5 og 13	Fe ³⁺	- NTA	15 min.	5 min.
6 og 14	Fe ³⁺	- EDDP α	18 min.	10 min.
7 og 15	Fe ³⁺	- EDDP β	31 min.	19 min.
8 og 16	Fe ³⁺	- HIMDA	20 min.	20 min.

0

B. Testmidlet

Eksempel 17

Der udføres et forsøg, hvor et testmiddel i fast
5 tilstand fremstilles i overensstemmelse med opfindelsen.
Midlet omfatter en bærematrix af papir, der er inkorpore-
ret med materialet ifølge opfindelsen som beskrevet i ek-
sempel 1, men med den undtagelse, at koncentrationerne af
10 bestanddelene varieres til afpasning efter den faste til-
stand. Inkorporering af matrixen med materialet og dannel-
sen af testanordningen udføres under anvendelse af de føl-
gende procedurer:

Et 50 mM, 1:1 (mol:mol) ferrichelat af N-(2-hydroxy-
ethyl)-ethylendiamintriethyldikesyre (Fe-HEDTA) fremstilles
15 ved opløsning i 100 ml destilleret vand af 1,39 g N-(2-hy-
droxyethyl)-ethylendiamintriethyldikesyre, hvorpå der til op-
løsningen sættes 1,35 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Der fremstilles to opløsninger, hvis sammensætning
er angivet i det følgende. Til fremstilling af testmateria-
20 let imprægneres derpå et stykke Whatman 3 MM filterpapir
med de omtrentlige dimensioner 15 cm x 10 cm med rea-
gensopløsningerne, således at papiret bliver fuldstændigt
inkorporeret med reagensmaterialet efter den anden neddyp-
ning. Den anvendte procedure involverer imprægnering af
25 papiret ved neddypning deraf i den første opløsning, tør-
ring af det imprægnerede papir og derefter yderligere impræg-
nering af det tørrede papir ved neddypning i den anden op-
løsning, efterfulgt af en afsluttende tørring. Tørringen
udføres i en ovn med forceret træk ved 105°C i ca. 8 minut-
30 ter efter den første imprægnering og ved ca. 50°C i ca.
5 minutter efter den anden imprægnering.

Den første reagensopløsning fremstilles ved blanding
af de følgende bestanddele:

35

0	Destilleret vand	74,0 ml
	1 M Tris-malonat-puffer, pH 6,5	10,0 ml
	5,5 M cumen-hydroperoxid	4,0 ml
	10 g/dl natriumdodecylsulfat	2,0 ml
5	50 mM Fe-HEDTA (fremstillet som tidligere beskrevet)	10,0 ml

Den anden reagensopløsning fremstilles ved blanding af følgende bestanddele:

10	Ethanol	79,4 ml
	6-methoxyquinolin, fri baseform	0,6 ml
	20% (w/v) polyvinylpyrrolidon (vandig) (molekylvægt 40.000)	20,0 ml
	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin	0,6 g

15

Det tørrede, imprægnerede papir lamineres til den ene side af et stykke dobbeltsidet adhæsivt overføringstape, der er kommercielt tilgængeligt fra 3M Company, St. Paul, Minn. 55144. Laminatet opskæres dernæst i stykker, der måler ca.

20

15 cm x ca. 0,5 cm. Et af disse stykker knyttes ved hjælp af den ubenyttede adhæsive side til et polystyrenark, der måler ca. 9 cm x ca. 15 cm, og det resulterende laminat opskæres parallelt med dets korte dimension til dannelselse af testmaterialer omfattende en ca. 9 cm aflag polystyrenstrimmel, der bærer et kvadrat af det imprægnerede papir ved den ene ende, idet den anden ende tjener som et håndgreb.

25

Afprøvning af testmaterialer fremstillet ved fremgangsmåden ifølge eksempel 17, i urinprøver, der indeholder forskellige koncentrationsniveauer af hæmoglobin og en koncentration på 50 mg ascorbat pr. dl, giver let skelnelige blå farveniveauer, der svarer til de forskellige hæmoglobin-niveauer, hvilket viser materialets evne til detektering af det tilstedeværende hæmoglobin til trods for prøvernes høje indhold af ascorbat.

30

35

0

Eksempel 18

Forsøget fra eksempel 17 gentages, men med den undtagelse, at der anvendes 10,0 ml af en 50 mM Fe-EDTA-opløsning i den første reagensopløsning i stedet for Fe-HEDTA.

5

Afprøvning af materialer, der er fremstillet ifølge eksempel 18, udføres som tidligere beskrevet med urinprøver indeholdende forskellige koncentrationsniveauer af hæmoglobin og 50 mg ascorbat pr. dl, og der fås let skelnelige blå farveniveauer svarende til de forskellige hæmoglobin-niveauer.

10

Eksempel 19

Forsøget fra eksempel 17 gentages, men med den undtagelse, at der anvendes 10,0 ml af en 50 mM Fe-CDTA-opløsning i den første reagensopløsning i stedet for Fe-HEDTA.

15

Afprøvning af materialer eller -anordninger, der er fremstillet ifølge eksempel 19, udføres som tidligere beskrevet med urinprøver indeholdende forskellige koncentrationsniveauer af hæmoglobin og 50 mg ascorbat pr. dl, og der fås let skelnelige blå farveniveauer svarende til de forskellige hæmoglobin-niveauer.

20

Eksempel 20

Forsøget fra eksempel 17 gentages, men med den undtagelse, at der anvendes 10,0 ml af en 50 mM Fe-IMDA-opløsning i den første reagensopløsning i stedet for Fe-HEDTA.

25

Afprøvning af materialer, der er fremstillet i overensstemmelse med eksempel 20, udføres som tidligere beskrevet med urinprøver indeholdende forskellige koncentrationer af hæmoglobin og 50 mg ascorbat pr. dl, og der fås let skelnelige blå farveniveauer svarende til de forskellige hæmoglobin-niveauer.

30

35

0

Eksempel 21

Forsøget fra eksempel 17 gentages, men med den undtagelse, at der anvendes 10,0 ml af en 50 mM Fe-NTA-opløsning i den første reagensopløsning i stedet for Fe-HEDTA.

5

Afprøvning af testmaterialer, der er fremstillet ifølge eksempel 21, udføres som beskrevet i det foregående med urinprøver indeholdende forskellige koncentrationer af hæmoglobin og 50 mg ascorbat pr. dl, og der fås let skelnelige blå farveniveauer svarende til de forskellige hæmoglobin-niveauer.

10

C. Testmateriale. Ascorbat-interferens-resistens og -stabilitet.

Der gennemføres yderligere forsøg til bedømmelse af evnen hos testmaterialerne, der er fremstillet som beskrevet i eksempel 17, til detektering af hæmoglobin i urin i nærværelse af ascorbat efter stress, der skal imitere lang tids opbevaring. Forsøgene udføres med nogle af materialerne umiddelbart efter, at de er fremstillet, samt med andre materialer, efter at disse er blevet opbevaret i udstrakte perioder under forhøjede temperaturbetingelser. I særdeleshed testes og sammenlignes materialerne med hensyn til ydeevne umiddelbart efter fremstillingen ved stuetemperatur (ca. 23°C) og efter 10 og 28 dage med "varme-stress" ved ca. 50°C i en ovn.

25

Der fremstilles en række urin-testopløsninger, der indeholder forskellige hæmoglobinniveauer. Der fremstilles også to hæmoglobinopløsninger, de indeholder ascorbat i en koncentration på 50 mg/dl.

30

Der fremstilles en forrådsopløsning indeholdende 15,4 mg hæmoglobin pr. dl ved fortynding af helblod med destilleret vand til en koncentration på 15,4 mg hæmoglobin pr. 100 ml vand. Hæmoglobininholdet i helblodet er i forvejen blevet bestemt ved anvendelse af konventionel teknik.

35

En prøve af sammenblandet urin, der tidligere er screenet

0 som negativ med hensyn til hæmoglobin og ascorbinsyre, hen-
stilles som en blindprøve. Testopløsningerne fremstilles der-
næst ved afpipettering af aliquoter af blodopløsningen i den
sammenblandede urin til dannelselse af urinopløsninger indehol-
5 dende 0,015, 0,031, 0,062 og 0,139 mg hæmoglobin pr. dl. En
del af urinopløsningerne indeholdende 0,031 og 0,062 mg hæ-
moglobin pr. dl isoleres i særskilte beholdere, og der til-
sættes ascorbinsyre således, at opløsningerne bringes op på
et niveau af 50 mg ascorbat pr. dl umiddelbart forud for af-
10 prøvningen.

Et sæt testmaterialer, der er fremstillet som beskrevet i eksempel 17, samt et kontrolsæt, der er fremstillet som beskrevet i det nævnte eksempel, men med den undtagelse, at de ikke indeholder noget Fe-HEDTA, testes ved blindforsøg
15 og i hver af hæmoglobin-urin-opløsningerne. Materialerne neddyppes momentant i hver opløsning, hvorefter de fjernes, og farvedannelse i materialerne iagttages efter 1 minuts forløb. De farver, der dannes, sammenlignes visuelt med hinanden og med et standard-farvekort til fastlæggelse af den relative
20 intensitet 1 minut efter neddyppningen. Farverne strækker sig fra farveløs (for blindprøvens vedkommende) til mørk grønblå med hæmoglobinopløsningen indeholdende 0,138 mg/dl.

Resultaterne af denne afprøvning, der sammenfattet i den følgende tabel, viser, at de her omhandlede testmaterialer, når de afprøves i de to hæmoglobinprøver indeholdende
25 ascorbat, såvel efter at være frisk fremstillet som efter udsættelse for forhøjet temperatur på 50°C i 10 dage, giver farve-respons på nærværelsen af hæmoglobin ligesom respons fra de materialer, der anvendes til afprøvning af urinprøverne uden
30 ascorbat. Resultaterne fra tilsvarende afprøvning af kontrolmaterialerne, der ikke omfatter Fe-HEDTA, viser, at det respons, der fås fra kontrolmaterialerne, hæmmes praktisk taget fuldstændigt på grund af ascorbat i prøven. De materialer, der fremstilles ifølge den foreliggende foretrukne udførelsesform
35 for opfindelsen udviser imidlertid en evne til let detektering

0

af hæmoglobin i koncentrationer på 0,031 og 0,062 mg/dl, til trods for nærværelsen af en ascorbatkoncentration på 50 mg/dl. Nærværelsen af Fe-HEDTA viser sig således på drastisk vis at kompensere for ascorbat-interferens.

5

10

15

20

25

30

35

Stabilitets-ydeevne af teststrimmelmaterialer
ifølge opfindelsen indeholdende Fe-HEDTA

Urinprøve hæmoglobin (mg/dl) (ingen ascorbinsyre)	Frisk fremstillede strimler ved omgi- velsernes temperatur *	Strimler opbevaret ved 50°C i 10 dage *	Strimler opbevaret ved 50°C i 28 dage *	Frisk fremstillede strimler ved omgivelsernes temp. uden Fe-HEDTA * (kontroller)
O (blindprøve)	10	10	10	10
O,015	20	20	15	22
O,031	25	25	22	30
O,062	32	30	30	35
O,139	45	40	38	40
(50 mg/dl ascor- binsyre)				
O,031	25	22	20	10
O,062	32	30	28	10

* Tallene i tabellen refererer til teststrimmel-ydeevne som målt med et standard-farvekort for eksisterende okkult blod-strimler. Farvekortet kan fås fra Ames Division, Miles Laboratories, Inc., på mærkningen for testen for okkult blod tilgængelig som HEMASTIX (R). På dette farvekort er en værdi på "10" en negativ aflæsning, "20" repræsenterer spor af hæmoglobin eller 0,015 mg/dl, og "30" og "40" svarer til henholdsvis 0,046 og 0,139 mg/dl hæmoglobin.

0

Resultaterne i den foranstående tabel viser også, at der kun er lille forskel i reaktivitet mellem testmaterialerne ifølge opfindelsen, der er blevet frisk fremstillet, og de, der er blevet opbevaret ved 50°C i 10 dage eller i 28 dage. Dette resultat står i modsætning til det forventede resultat: at interaktion mellem ferrichelat og et hydroperoxid i samme testmateriale ville forårsage en nedsættelse af materialets reaktivitet ved en højere hastighed under varme-stress end ved opbevaring ved omgivelsernes temperatur. Dette demonstrerer den gode stabilitet og fordelagtige opbevarings-levetid for materialet og midlet ifølge opfindelsen. Som det ses af de i tabellen angivne data, er der øjensynlig kun lille eller ingen inkompatibilitet mellem det organiske hydroperoxid og Fe-HEDTA, mellem Fe-HEDTA og indikatoren, eller mellem disse stoffer og andre strimmel-bestanddele, selv efter forlænget opbevaring ved forhøjede temperaturer. Endvidere er metalchelat (Fe-HEDTA)-indeholdende testmaterialer og materialer, der tilsvarende fremstilles uden Fe-HEDTA, i det væsentlige ens med hensyn til sensitivitet for nærværelsen af hæmoglobin i testopløsninger uden ascorbat og viser en undgåelse af "falske positive"-resultater, hvilket viser reagensernes fremragende forenelighed. Medens imidlertid materialerne, der er fremstillet uden Fe-HEDTA, praktisk taget fuldstændigt inhiberes ved tilstedeværelsen af ascorbat i testopløsningerne, inhiberes strimlerne ifølge opfindelsen indeholdende Fe-HEDTA i langt mindre grad af ascorbat, og de er i virkeligheden i stand til at give respons, gennem fremkomsten af visuelt skelneligt farve efter 1 minut, på hæmoglobinniveauer så lave som 0,031 og 0,062 mg/dl.

30 Til yderligere påvisning af fordelene ved den foreliggende opfindelse udføres der yderligere eksperimentel afprøvning svarende til den foran beskrevne under anvendelse af midler, som fremstilles i eksempel 17, dvs. indeholdende Fe-HEDTA. Imidlertid følges farvedannelsen i stedet for ved
35 anvendelse af en visuel teknik ved benyttelse af et apparatur,

0

der er kendt som en hurtigscanner ("Rapid Scanner"). Dette apparat er et scannings-reflektansspektrofotometer, der er tilsluttet en laboratorie-mikrocomputer. Instrumentet anvendes til hurtig måling af reflektansspektre i det syn-

5 lige område. Computeren muliggør oplagring af spektraldata og udfører beregninger. Målinger af ydeevnen af reagensstrimler i hurtigscanneren har eksempelvis de følgende fordele i forhold til visuel iagttagelse af de samme strimler:

1. Lyskilden og betingelserne omkring prøven forbliver fikserede. Ved visuel iagttagelse kan lyskilden variere, ikke blot med hensyn til bølgelængde, men også i relation til positionen af den strimmel, som iagttages.

10

2. Detektor-karakteristika forbliver fikserede. Ved visuel iagttagelse kan detektoren, dvs. iagttagerens øjne, variere fra person til person, og med en og samme person fra dag til dag.

15

3. Hurtigscanneren tillader mere præcis kvantisering af data end visuel iagttagelse, hvorved man opnår at kunne sammenligne resultater på en mere objektiv måde.

20 Rapid-Scanner-instrumentet er konstrueret af Ames Division af Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, hvorfra fuldstændige informationer med hensyn til strukturelle karakteristika og ydeevne kan fås, jfr. også M.A. Genshaw og R.W. Rogers, Anal. Chem., bind 53, side 1949-1952 (1981).

25 Tri-stimulus-værdier fra hurtigscanneren anvendes til at beregne farvedifferensværdier (ΔE) ifølge den konvention, der findes i "Supplement No. 2 Commission Internationale de L'Eclairage (Paris, France), Publication No. 15, Colorimetry, (E. -1.3.1), 1971". De opnåede data fra dette instrument er derfor angivet i det følgende som ΔE -værdier eller farvedifferensenheder.

30

Teststrimlerne ifølge opfindelsen, der indeholder Fe-HEDTA, testes under anvendelse af den i det foregående beskrevne procedure for deres evne til detektering af hæmoglobinkoncentration på 0,031 mg/dl og 0,062 mg/dl. Nogle af

35

0

strimlerne testes i urinprøver indeholdende 50 mg ascorbat pr. dl, og nogle testes i lignende prøver, der ikke indeholder ascorbat, idet nogle testes efter at være frisk fremstillet ved omgivelsernes temperatur, og nogle testes efter opbevaring ved omgivelsernes temperatur og 50°C i perioder på henholdsvis 11 og 28 dage.

De farvedifferensenheder (ΔE) der fås ved hjælp af hurtigscanneren, svarer til forskellige hæmoglobinniveauer. Når strimlerne indeholdende Fe-HEDTA testes i urinprøver indeholdende 0,031 og 0,062 mg hæmoglobin pr. dl, med eller uden tilstedeværende ascorbat, fås de resultater, der fremgår af de følgende tabeller:

Frisk fremstillede testanordninger

	<u>Urinprøve</u>		<u>Hurtigscanningsresultater (ΔE)</u>
	Hæmoglobin (mg/dl)	Ascorbinsyre (mg/dl)	Testanordning
15	0,031	0	21,89
	0,031	50	15,75
20	0,062	0	29,78
	0,062	50	22,84

Anordninger opbevaret ved omgivelsernes temperatur i 28 dage

	<u>Urinprøve</u>		<u>Hurtigscanningsresultater (ΔE)</u>
	Hæmoglobin (mg/dl)	Ascorbinsyre (mg/dl)	Testanordning
25	0,031	0	15,50
	0,031	50	13,29
30	0,062	0	26,31
	0,062	50	18,20

35

0

Anordninger opbevaret ved 50°C i 11 dage

Urinprøve

	Hæmoglobin (mg/dl)	Ascorbinsyre (mg/dl)	<u>Hurtigscanningsresultater (ΔE)</u> Testanordning
5	0,031	0	20,86
	0,031	50	12,36
	0,062	0	30,04
	0,062	50	27,26

10

Anordninger opbevaret ved 50°C i 28 dage

Urinprøver

	Hæmoglobin (mg/dl)	Ascorbinsyre (mg/dl)	<u>Hurtigscanningsresultater (ΔE)</u> Testanordning
	0,031	0	10,31
15	0,031	50	7,78
	0,062	0	20,86
	0,062	50	16,38

20 De foregående forsøg viser instrument-data, der bekræfter de visuelle data, der fremgår af det foregående. De pågældende data viser stabiliteten af de her omhandlede materialer samt en signifikant ophævelse af ascorbat-interferens i sådanne materialer, selv efter lang tids opbevaring og opbevaring ved forhøjede temperaturer.

25 Yderligere visuel afprøvning udføres på et sæt testmaterialer, der er fremstillet ifølge opfindelsen som beskrevet i det foregående eksempel 18, dvs. som indeholder Fe-EDTA. Efter fremstilling af materialerne testes disse i urinprøver indeholdende forskellige koncentrationer af hæmoglobin, og i 30 prøver, der ikke indeholder hæmoglobin, samt i prøver med to hæmoglobinniveauer, der også indeholder 50 mg ascorbat pr. dl. Nogle af materialerne testes umiddelbart efter fremstillingen, og nogle testes efter opbevaring i en ovn ved 50°C i 28 dage. Resultaterne af denne afprøvning fremgår af den følgende 35 tabel, i hvilken tallene svarer til de visuelle farve-

0

værdier, der opnås ved reference til det tidligere omtalte HEMASTIX[®]-standard-farvekort. Al afprøvning af disse materialer udføres som beskrevet i det foregående.

5

Stabilitets-ydeevne af teststrimmelanordninger
ifølge opfindelsen indeholdende Fe-EDTA

	Hæmoglobin (mg/dl) (ingen ascorbinsyre)	Frisk fremstillede strimler ved omgi- velsernes temp.	Strimler opbevaret ved 50°C i 28 dage
	0	10	10
10	0,015	12	11
	0,031	20	15
	0,062	30	22
	0,139	35	30
15	(50 mg/dl ascorbinsyre)		
	0,031	20	14
	0,062	30	22

Resultaterne af disse ovennævnte forsøg bekræfter stabiliteten, undgåelsen af falske positive resultater samt en væsentlig resistens mod ascorbat-inhibering i materialer, der er fremstillet ifølge denne udførelsesform for opfindelsen.

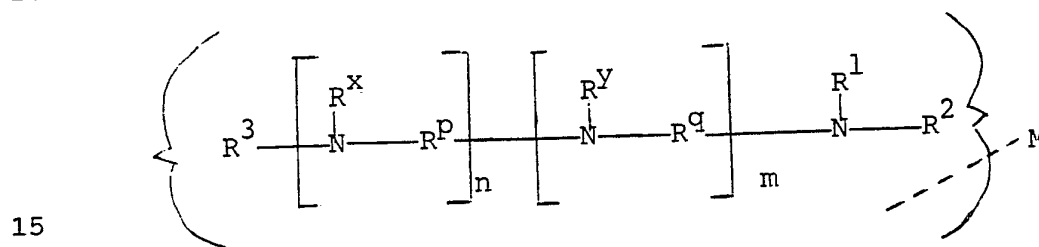
25

30

35

P a t e n t k r a v .

1. Materiale til detektering af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve, hvilket materiale
 5 indeholder et organisk hydroperoxid og en indikator, der er i stand til at tilvejebringe et detekterbart respons i nærværelse af det peroxidativt aktive stof og peroxid, k e n - d e t e g n e t ved, at materialet yderligere omfatter et metalchelatat af et polycarboxyalkylamin-derivat med den almene
 10 formel



i hvilken

(a) R^1 betyder hydrogen eller ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med
 20 fra 2-3 carbonatomer, R^2 , R^3 , R^X og R^Y , der er ens eller forskellige, er ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, idet mindst to af substituenterne R^1 , R^2 , R^3 , R^X eller R^Y er alkylcarboxylsyre-grupper som defineret ovenfor,

25 (b) R^P og R^Q , der er ens eller forskellige, er ligekædede eller forgrenede alkylengrupper med fra 1-3 carbonatomer eller divalente 1,2-cycloaliphatiske grupper med fra 6-9 carbonatomer,

(c) n er et helt tal med en værdi fra 0 til 1, m er
 30 et helt tal med en værdi fra 0-2, idet såfremt m er 2, 2 R^Q -grupper kan være ens eller forskellige, og

(d) M betyder Fe^{+3} .

2. Materiale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at

- (a) m er 0, n er 1, og
- (b) R^P er en ethylengruppe.

5

3. Materiale ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at mindst to af substituenterne R¹, R², R³, R^X og R^Y er alkylcarboxyl-gruppen -CH₂COOH.

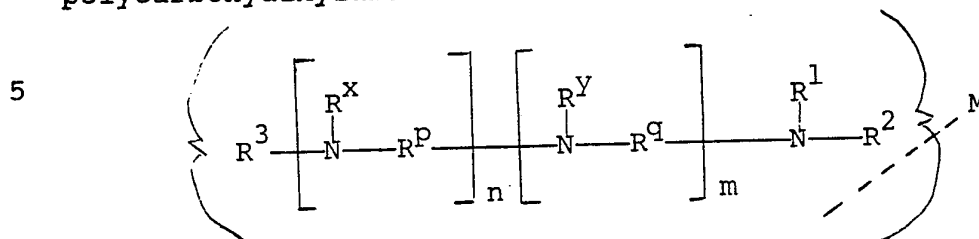
10 4. Materiale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, ved at metalchelatat er udvalgt fra gruppen bestående af ferrichelater af N-(2-hydroxyethyl)-ethylendiamintri-dikesyre, ethylendiamintetraeddikesyre, cyclohexylendiamin-tetraeddikesyre, nitrilotrieddikesyre, iminodieddikesyre,
15 α -ethylendiamindieddikesyre-dipropionsyre, β -ethylendiamin-dieddikesyre-dipropionsyre, hydroxylethylaminodieddikesyre og blandinger deraf.

5. Materiale ifølge ethvert af kravene 1-4, k e n -
20 d e t e g n e t ved, at det organiske hydroperoxid er cumen-hydroperoxid, og at indikatoren er 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin.

6. Testmiddel til bestemmelse af nærværelsen af et
25 peroxidativt aktivt stof i en testprøve, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter en bærermatrix, hvori der er inkorporeret et materiale ifølge ethvert af kravene 1-5.

7. Fremgangsmåde til fremstilling af et testmiddel
30 til bestemmelse af nærværelsen af et peroxidativt aktivt stof i en testprøve, hvor testmidlet er resistent mod interfererende virkninger af ascorbat, der kan være til stede i prøven, k e n d e t e g n e t ved, at denne fremgangsmåde omfatter følgende trin:

a) fremstilling af en første reagensopløsning indeholdende et organisk hydroperoxid og et metalchelatat af et polycarboxyalkylamin-derivat med den almene formel



i hvilken

10 (i) R^1 betyder hydrogen eller ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, R^2 , R^3 , R^X og R^Y , der er ens eller forskellige, er ligekædede eller forgrenede alkylalkohol- eller alkylcarboxylsyre-grupper med fra 2-3 carbonatomer, idet
15 mindst to af substituenterne R^1 , R^2 , R^3 , R^X eller R^Y er alkylcarboxylsyre-grupper som defineret ovenfor,

(ii) R^P og R^Q , der er ens eller forskellige, er ligekædede eller forgrenede alkylengrupper med fra 1-3 carbonatomer eller divalente 1,2-cycloaliphatiske grupper med
20 fra 6-9 carbonatomer,

(iii) n er et helt tal med en værdi fra 0 til 1, m er et helt tal med en værdi fra 0 til 2, idet såfremt m er 2, 2 R^Q -grupper kan være ens eller forskellige, og

(iv) M betyder Fe^{+3} ,

25 b) inkorporering af den første reagensopløsning i en bærermatrix ved fugtning af matrixen med den første opløsning,

c) tørring af den fugtede matrix til efterladelse af en remanens af metalchelatatet og hydroperoxidet,

30 d) fremstilling af en anden reagensopløsning indeholdende en indikator og et opløsningsmiddel, idet indikatoren er i stand til at tilvejebringe et detekterbart respons i nærværelse af et peroxid og det peroxidativt aktive stof,

e) inkorporering af den anden reagensopløsning i den
35 tørrede bærermatrix ved fugtning af matrixen med den anden reagensopløsning, og

f) tørring af matrixen til efterladelse af en kombineret remanens indeholdende metalchelatat, hydroperoxidet og indikatoren.

- 5 8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g -
n e t ved, at der som indikator anvendes benzidin, o-tolidin, en 3,3',5,5'-tetra-(lavere alkyl)-benzidin, 2,7-diaminofluoren eller blandinger deraf.
- 10 9. Fremgangsmåde ifølge krav 7 eller 8, k e n d e -
t e g n e t ved, at det organiske hydroperoxid er udvalgt fra gruppen bestående af cumen-hydroperoxid, tert.butylhydroperoxid, diisopropylbenzen-hydroperoxid, 2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid, paramethan-hydroperoxid og blander
15 dinger deraf.