



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) № 160397

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁴ G 01 N 33/52, 33/84,
G 01 N 31/22

(21) Patentsøknad nr. 811781

(22) Inngivelsesdag 26.05.81

(24) Løpedag 26.05.81

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver MILES INC.,
P.O. Box 40,
1127 Myrtle Street,
Elkhart, IN 46515,
USA.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 30.11.81

(44) Utlegningsdag 02.01.89

(72) Oppfinner STEVEN C. CHARLTON, Elkhart, IN,
USA.

(74) Fullmektig Mag.scient. Knud-Henry Lund,
Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 27.05.80, US, nr. 153883.

(54) Oppfinnelsens benevnelse INTEGRERT ANALYTISK ELEMENT.

(57) Sammendrag

En fremgangsmåte for bestemmelse av et ion i en væskeprøve og et analytisk element for anvendelse ved slike bestemmelse er omtalt. Ved den beskrevne fremgangsmåte bringes et analytisk element i kontakt med prøver i nærvær av et påviselig emne som er bundet til den ioniske analytten. Det analytiske element omfatter et sjikt av i det vesentlige ikke-polart materiale innarbeidet med en analytt-spesifikk ionofor, og måling av mengden av påviselig emne som har migrert til i det minste en overflatedel av nevnte analytiske element. Mengden av nevnte påviselige emne som har migrert er et mål for konsentrasjonen av den spesifikk ioniske analytt i prøven. Det analytiske element kan omfatte et sjikt av i det vesentlige ikke-polart materiale innarbeidet med en analytt-spesifikk ionofor og laminert i forhold til dette, et andre sjikt blandet med et påviselig emne i forbindelse med nevnte ioniske analytt.

(56) Anførte publikasjoner USA (US) patent nr. 3856649, 4042335.

Oppfinnelsen vedrører et intergrert analytisk element for kolorimetrisk eller fluorimetrisk bestemmelse av konsentrasjonen av litium, natrium eller kalium i en flytende prøve.

5 Tallrike artikler har vært publisert som omtaler forholdet av ioner og ionoforer såvel som deres elektrokjemiske karakteristikk og som følge derav bestemmelse av ionisk aktivitet ved elektrodeinnretninger.

10 Når to oppløsninger som har forskjellig ionekonsentrasjoner, plasseres i kontakt med hverandre, utvikles et potensial eller elektromotorisk kraft (EMF) som er proporsjonal til:

$$\log \frac{(\text{ioneaktivitet})_1}{(\text{ioneaktivitet})_2}$$

15 De to oppløsningene kan adskilles ved hjelp av en barriere som forhindrer blanding, men tillater elektrisk kontakt, dvs. et fritte. Alternativt kan anvendes som membran som inneholder en ionofor, slik som valinomycin. Egenskapen til
20 membranet er slik at i fravær av ionoforen er motstanden så høy at det virker som en åpen strømkrets (ikke stor nok strømmengde for å drive et voltmeter) og ingen EMF kan måles. I nærvær av kalium (K^+), danner valinomycin (V) en transmissjonsvei på tvers av membranet ved binding av K^+ slik at det
25 strømmer en svakstrøm. Et slikt system kan illustreres som følgende:

	Cl^-	K^+	Membran, fase 2	K^+	
30				Cl^-	
	K^+	Cl^-	V	Cl^-	
	Testoppløsning	Cl^-	V	K^+	Referanse-
	fase 1	K^+			oppløsning
35		Cl^-	V	Cl^-	fase 3

160397

2

En referansekonsentrasjon av K^+ (fase 3) forefinnes på en side av membranet og utviklet EMF måles og anvendes for å beregne den ukjente konsentrasjon fra Nernst's-ligning. På grunn av at K^+ er det eneste kation som er bundet til valinomycin, dannes den ledende forbindelse bare for K^+ -ion og den EMF som utvikles, er bare avhengig av K^+ konsentrasjons-gradienten på tvers av membranet. Den strøm som strømmer er så ørliten at ingen vesentlig mengde av K^+ eller mot-ion transporteres gjennom membranet. En hovedvanskelighet ved anvendelse av slike ione-selektive elektroder har vært deres tendens til forringelse av deres nøyaktighet og minskning av følsomhet over tid. Videre foretas avledninger av disse ved hjelp av en logaritmisk funksjon, slik at små forandringer i ione-konsentrasjonen krever en avansert volmeterinnretning.

Det har vært kjent at makrocykliske antibiotika, slik som beskrevet ovenfor, har en effekt på de elektriske verdier av fosfolipide to-sjikt membraner, biologiske membraner, slik at disse antibiotika oppløser kationer inne i membranet, i form av mobile ladede komplekser, hvorved fremskaffes en "barriere" mekanisme ved hvilken kationer kan beveges over det indre isolerende hydrokarbon i membranet. Slike komplekser har det eneste formål å bære ladningen av komplekset gjennom membranet slik at en spenningsdifferensial kan bestemmes mellom oppløsninger på hver side av membranet.

I et annet studieområde omtaler Eisenman et al., J. Membrane Biol. 1:294-345 (1969) selektiv ekstaksjon av kationer fra vandige oppløsninger til organiske oppløsninger makrotetralide aktin antibiotika. Eksperimentene omfatter lett rysning av en organisk oppløsningsmiddelfase inneholdende antibiotika med vandige oppløsninger inneholdende forskjellige kationiske salter av et lipid-løselig farget antion. Intensiteten av fargen av den organiske fase måles deretter spektrofotometrisk for å vise hvor mye salt som har blitt ekstrahert. Eisenman forsøker ikke å måle ione-konsentrasjonen i den

vandige fase. Faseoverføring har også vært studert av Dix. et al., Angew. Chem. Int. ed. Engl. 17:857 (1978) og i oversikter omfattende Burgermeister et al., Top. Curr. Chem. 69:91 (1977): Yu et al., Membrane Active Complexones, Elsevier, Amsterdam (1974); og Duncan, Calcium in Biological Systems, Cambridge University Press (1976).

Fordeling av en forbindelse mellom væsker er hurtig og effektiv som vist av Eisenman, på grunn av deres bevegelige egenskaper som tillater den transporterte forbindelse å diffundere hurtig vekk fra grenseflaten. En slik mekanisme er normalt umulig i fast fase som er kjennetegnet ved stivhet, ubevegelighet og i det vesentlige null diffusjon.

Derfor mangler enhver art av instrumenter eller innretninger som er i fast form ved hvilke konsentrasjoner av ioner i en oppløsning kan bestemmes fotometrisk. Endog ved dyre og besværlige innretninger er ingen visuell måling av ionekonsentrasjon tilgjengelig ved anvendelse av analytiske teknikker i fast form. Således er innretninger fast form for bestemmelse av ionekonsentrasjoner, egnet for klinisk-kjemisk anvendelse, har hittil ikke vært tilgjengelige.

Fig. 1 er en grafisk fremstilling av data ved anvendelse av tris-2-etylheksylfosfat som mykningsmiddel, som angitt i tabell 4.

Fig. 2 er en grafisk fremstilling av data ved anvendelse av di-2-etylheksylsebakat som mykningsmiddel, som angitt i tabell 4.

Fig. 3 er en grafisk fremstilling av data ved anvendelse av "Phloxine B" som mot-ion, som angitt i tabell 5.

Fig. 4 er en grafisk fremstilling av data ved anvendelse av orange IV som mot-ion, som angitt i tabell 5.

Fig. 5 er en grafisk fremstilling av data ved anvendelse av "Eosin Y" som mot-ion, som angitt i tabell 5.

Fig. 6 er en grafisk fremstilling av data ved anvendelse av DCPIP som mot-ion, som angitt i tabell 6.

160397

. 4

I henhold til foreliggende oppfinnelse er det fremskaffet et integrert analytisk element til bruk i en metode for bestemmelse av et ion i en væskeprøve og et komplett analytisk element for anvendelse ved slike bestemmelser.

5 Mere spesielt omfatter metoden som skal omtales, å bringe i kontakt et komplett analytisk element med prøve i nærvær av et påviselig emne i forbindelse med nevnte analytt, nevnte analytiske element omfatter et sjikt av et i det vesentlige ikke-polart materiale i blanding med en analytisk-spesifik ionofor, og fotometrisk måling av mengden av det påviselige
10 emne som har migrert til i det minste en overflatedel av det analytiske element, mengden av nevnte påviselige emne som har migrert, samsvarer med konsentrasjonen av den spesifikke ioniske analyt i prøven. Det reagerte element er stabilt og
15 avlesningene er likeartede pålitelige over i det minste en periode av dager, slik at, f.eks. et antall reagerte elementer kan oppsamles for avlesning på en gang.

Oppfinnelsen vedrører altså et integrert analytisk element
20 for kolorimetrisk eller fluorimetrisk bestemmelse av konsentrasjonen av litium, natrium eller kalium i en flytende prøve, idet elementet er karakterisert ved at det omfatter:

a) et første lag sammensatt av et vesentlig ikke-polart materiale festet til en bærer og inkorporert med en ionespesifik ionofor, istand til selektivt å danne et kompleks med
25 ionet som skal bestemmes, og i et laminært forhold til det første lag,

b) et andre lag inneholdende et negativt ladet motionsfargestoff til ionet som skal bestemmes.

30 Refererende til det lamellaktige forhold mellom et ionofort sjikt og ytterligere et eller flere sjikt, innebærer dette at et fluidium, enten gass- eller væskeformet, kan passere mellom overliggende overflater av slike sjikt. Slike sjikt
35 kan være kontinuerlige eller adskilte av mellomliggende sjikt. Hvilke som helst mellomliggende sjikt vil være av en slik egenskap at det ikke forhindrer passasje mellom alle

sjikt. Det analytiske sjikt kan være selvunderstøttende eller være båret av en understøttelse, slik som en understøttelse som kan transmittere elektromagnetisk stråling av en eller flere bølgelengder innen området mellom 200 nm til 900 nm.

Som nevnt ovenfor er hensikten med oppfinnelsen en metode for bestemmelse av konsentrasjonen av en spesifikk analytt i en væskeformet prøve, hvilken metode omfatter å bringe i kontakt et komplett analytisk element med prøve i nærvær av et påviselig emne i forbindelse med nevnte analyt. Nevnte analytiske element omfatter et sjikt av i det vesentlige et ikke-polart materiale blandet med en analytisk spesifikk ionofor; og fotometrisk måling av mengden av nevnte påviselige emne som har migrert til i det minste en overflatedel av nevnte analytiske element. Mengden av det påviselige emnet som har migrert er betegnende for konsentrasjonen av den spesifikke ioniske analyt i prøven. Etter nevnte kontaktbringning og måling kan den nevnte metode evt. omfatte ytterligere trinn for fjerning av hvilken som helst overflødig prøve fra nevnte analytiske element. Fotometrisk måling betraktes å omfatte kolorimetrisk og fluorimetrisk måling.

I en utførelse omfatter trinnet med kontaktbringelsen tilsetning til nevnte væskeprøve en påviselig bestanddel som er tilknyttet nevnte ioniske analyt, og deretter å bringe i kontakt nevnte analytiske element med en prøve som inneholder en påviselig bestanddel. I en annen utførelse omfatter nevnte kontaktbringelse å bringe i kontakt et analytisk element med prøven, nevnte analytiske element omfatter et sjikt av i det vesentlige ikke-polart materiale blandet med en analytspesifikk-ionofor; og, i laminataktig forhold hertil, et andre sjikt blandet med et påviselig emne forbundet med nevnte ioniske analyt.

I et eksempel av multilagselement som beskrevet ovenfor, har det ionofore sjikt et par motstående overflater, nevnte sjikt

160397

6

for påvisning av et emne er i laminert forbindelse til en av nevnte overflater og nevnte kontaktbringelse omfatter å kontakte den andre av nevnte overflater. I et annet eksempel har sjiktet for påvisning av et emne et par motstående overflater, nevnte ionofore sjikt er i laminert forbindelse med en av nevnte to overflater og kontaktbringelsen omfatter å kontakte den andre overflaten.

Det ikke-polare materiale av nevnte filmsjikt kan være en sammensetning omfattende et mykningsmiddel og en ikke-polar polymer, egnet til å oppnå dimensjonsstabilitet. Egnede mykningsmidler kan omfatte ftalater, slik som di-pentylftalat, sebacatene, slik som di-2-etylheksylsebakat og fosfater, slike som tris-2-etyl-heksylfosfat. Egnede ikke-polare polymerer, slik som polyvinylklorid og polyuretan, kan omfatte slike som er egnet for å danne et polymert sjikt med matt overtrekk.

Par av ionoforer/ioner er f.eks. egnet for foreliggende oppfinnelse. Eksempler på slike par omfatter

4, 7, 13, 16, 21-pentaoksa-1,10-diazabicyklo-(8,8,5)trioksan ["Kryptofix R221"]/ Na^+ ;

4, 7, 13, 16, 21, 24-heksaoksa-1,10-diazabicyklo-(8,8,8)heksacosane ["Kryptofix 222"] K^+ og

4, 7, 13, 18-tetraoksa-1,10-diazabicyklo-(8,5,5)-eicosane ["Kryptofix 211"] Li .

Den påviselige bestanddel er fortrinnsvis et motion som er f.eks. et kromofor eller fluorofor. Et egnet kromofor er diklorfenolidofenol. Egnede fluoroforer omfatter fluoroscein og dets derivater, 8-anilino-1-naftalensulfonsyre, Erythrosin B og 7-amino-4-trifluormetylkoumarin.

Et slikt motion kunne likeledes være tilknyttet en annen komponent som er interreaktiv med et reagens som har vært blandet i det ionofore sjikt. På grunn av nærværet av et interreaktivt (dvs. kjemisk reaktivt) materiale, og en

likeartet synlig konsentrasjon av substans tilveiebragt på det ionofore sjikt, kan frembringes en likeartet, kvantitativ påviselig forandring i elementet. En slik forandring som kan være dannelse av eller tilintetgjørelse av farge eller fluorescens, kan påvises kvantitativt ved radiometrisk teknik, og dersom ønsket, ved automatisk radiometrisk føleinnretninger, slik som fotometriske innretninger.

Ved fremstilling av komplette analytiske elementer i henhold til oppfinnelsen, kan sjiktene fremstilles separat og lamineres for å danne det fullstendige element. Sjikt fremstilt på denne måte blir vanligvis belagt med oppløsning eller dispersjon på en overflate fra hvilken det tørrede sjikt kan fysikalsk frastrippes. Imidlertid, en vanlig metode som kan unngå problemer ved flere strippings- og lamineringstrinn, er å belegge et første sjikt på en strippet overflate eller en understøttelse, som ønsket, og deretter belegge etterfølgende sjikt direkte på de som tidligere er belagte. Slik belegning kan utføres for hånd ved anvendelse av en bladbelegningsinnretning, eller ved hjelp av en maskin ved anvendelse av slike teknikker som dypp- eller valsebelegning. Dersom det anvendes maskinbeleggingsteknikker, er det ofte mulig å belegge tilstøtende sjikt samtidig ved traktbeleggingsteknikker, som er meget kjent ved fremstilling av lys-sensitive fotografiske filmer og papir.

Mattede polymere sjikt, som omtalt ovenfor, kan dannes på et substrat ved oppløsning av en polymer i en blanding av to væsker, en av disse har et lavere kokepunkt og er et godt oppløsningsmiddel for polymeren og det andre har et høyere kokepunkt og er et ikke-oppløsningsmiddel, eller i det minste et dårlig oppløsningsmiddel for polymeren. En slik polymeroppløsning belegges deretter på substrat, og følges under kontrollerte betingelser. Oppløsningsmidlet med lavere kokepunkt fordampes lettere og belegget kan bli anriket i væsken som er et dårlig oppløsningsmiddel eller et ikke-oppløsningsmiddel. Ettersom fordampningen forløper, under

korrekte betingelser, danner polymeren et porøst sjikt. Flere forskjellige polymerer kan anvendes, alene eller i blanding, for fremstilling av porøse matte polymersjikt for anvendelse ved oppfinnelsen. Typiske eksempler omfatter pollykarbonat, polyamider, polyuretaner og celluloseestere, slik som celluloseacetat. For sjikt slik som de som inneholder et ionofor eller påviselig emne, kan fremstilles en belegningsoppløsning eller dispersjon omfattende matriksen og iblandet aktive materialer, belgges som angitt ovenfor og tørket for å danne et dimensjonsstabilt sjikt.

Tykkelsen av disse sjikt og deres grad av permeabilitet kan varieres i et stort område og avhenger av aktuell bruk. Tørirtykkelser av fra 5-100 mikron har vært vanlig, skjønt mere varierte størrelser kan være foretrukket under mere spesielle betingelser. F.eks. dersom forholdsvis større mengder av interaktivt materiale, dvs. polymere materialer som enzymer, er krevet, kan det være ønskelig å anvende noe tykkere sjikt.

Det kan også være ønskelig å forsyne elementet med ett eller flere refleksjonssjikt, evt. absorpsjonssjikt for påvisning av stråling, slik som å muliggjøre resultatpåvisning ved refleksjonsradiometri, dvs. refleksjonsfotometri eller en lignende teknikk. Slike refleksjonssjikt kan frembringes ved et av de ovenfor beskrevne sjikt eller frembringelse ved et tilleggssjikt som ikke har noen ytterligere funksjon inne i elementet. Pigmenter, slik som titandioksyd og bariumsulfat, som er reflektive, kan anvendes for å øke refleksjonsevnen i sjiktet. Matte polymerer kan også inneholdet et egnet refleksjonsmateriale. I en foretrukket utførelse kan den matte polymer inneholde også et pigment for å øke refleksjonsevnen eller andre funksjoner. Mengden av pigment som kan inneholdes i et sjikt sammen med en matt polymer kan varieres i et stort område, og mengder fra 1-10 vekt-deler av pigment pr. vekt-del av matt polymer er foretrukket, med fra 3-16 deler pigment pr. del av matt polymer er mest foretrukket.

I sjiktene til elementet kan det være fordelaktig å innarbeide ett eller flere overflateaktive materialer, slik som anioniske eller ikke-ioniske overflatematerialer. De kan f.eks. øke belegningsevnen av sjiktformuleringer og øke størrelsen og graden for fuktning i sjikt som ikke lett lar seg fukte av væskeprøver i fravær av et hjelpemiddel, slik som et overflateaktivt materiale. Ved valg av analyser kan det i sjikt av elementet også være ønskelig å tilsette materialer som kan uskadeliggjøre ikke-aktive ved kjemisk reaksjon eller på annen måte, materialer som spesielt kan skade slike analyser.

Som nevnt tidligere kan de komplette analytiske elementer være selvunderstøttende eller være belagt på en understøttelse. Egnede understøttelsesmaterialer omfatter papir og med polyolefin belagt papir, såvel som et flertall polymere materialer, slike som celluloseacetat, poly(etylen-tereftalat), polykarbonater og polyvinylforbindelser, slike som polystyren, etc. Understøttelsen kan være ugjenomsiktig eller den kan transmittere lys eller annen energi. Valg av understøttelse for et spesielt element vil være forenlig med den ønskede art av resultatpåvisning. Foretrukne understøttelser omfatter transparaente understøttelsesmaterialer egnet for transittering av elektromagnetisk stråling med en bølgelengde innen området mellom 200 nm og 900 nm. Understøttelsen trenger ikke, naturligvis, å transmittere over hele 200 - 900 nm området, skjønt for fluorometrisk påvisning av analytisk resultat gjennom understøttelsen er det ønskelig at understøttelsen transmitterer over et større båndområde, alternativt at det transmitterer ved absorpsjons- og emisjonsspektra ved fluorescerende materialer som anvendes for påvisningen. Det kan også være ønskelig å ha en understøttelse som transmitterer en eller flere smale bølgelengdebånd og er ugjenomsiktig for nærliggende bølgelengdebånd. Dette kan gjennomføres f.eks. ved impregnering eller belegning av understøttelsen med en eller flere farger som har egnede absorpsjonskarakteristikker.

Som det kan forstås kan det fremstilles et flertall av forskjellige elementer i henhold til oppfinnelsen, avhengig av valg av analyseformål. Elementer kan tilpasses et flertall former, omfattende forlengede strenger av hvilke som helst bredde, ark eller mindre strimler. Spesielle elementer kan tilpasses for en eller flere tester av ett enkelt emne eller for et flertall av tester av forskjellige emner. Ved de sistnevnte tilfeller kan det være ønskelig å belegge en felles understøttelse med en eller flere strimler eller hver eventuelt av forskjellig sammensetning for å danne et komposit element egnet for utførelse av et flertall av ønskede tester.

Komplette analytiske element i henhold til foreliggende oppfinnelse kan tilpasses for anvendelse ved utførelse av et bredt felt av kjemiske analyser, ikke bare i klinisk kjemi, men også i kjemisk forskning og i kjemiske prosesskontroll-laboratorier. De er godt egnet for anvendelse ved klinisk testing av kroppsvæske slik som blod, blodserum og urin, da dette arbeidet ofte utføres i et større antall av likeartede tester og testresultatene behøves ofte etter meget kort tid etter at prøven er tatt. Ved blodanalyse, f.eks. av multi-sjiktelementet tilpasses for utførelse av kvantitative analyser formange blodkomponenter som måles rutinemessig.

Foreliggende element anvendes ved tilføring til elementet en væskeformet prøve som skal analyseres.

Ved en typisk prosedyre ved anvendelse av foreliggende element, som kan utføres manuelt eller automatisk, tas element fra en forsyningsrull, strimmel, pakke eller annen kilde, og plasseres for mottagelse av en fri dråpe, kontaktsted eller annen form for væskeprøve, som slik fra en hensiktsmessig dispenser. Etter prøveapplikasjon, og ønskelig etter at den væskeformede prøve er blitt opptatt av sjiktet til hvilket de har blitt bragt i kontakt, utsettes elementet for hvilken som helst kondisjonering, slik som

oppvarmning, fukting e.l. som kan være ønskelig for å påskynde eller på annen måte lette erholdelsen av ønsket restresultat. Dersom det anvendes en automatisk prosedyre, kan det også være ønskelig å la elementet kunne utføre dets funksjon innen noen sekunder. Dette kan gjennomføres konvensjonelt ved egnet utvalg av forskjellige parametere, slik som sjikttykkelse, porevolum i porøst sjikt etc.

Etter at det analytiske resultat er oppnådd som en påviselig forandring, måles denne vanligvis ved å la elementet passere gjennom en sone hvor en egnet innretning for refleksjon, transmisjon eller flourescens fotometri er anbragt. En slik apparatur kan tjene til å lede en energistråle, slik som lys, gjennom, i en utførelse, understøttelsen. Lyset reflekteres deretter fra elementets bakside til en dektteringsinnretning eller passere gjennom elementet til en detektor i tilfelle av transmisjonsdetektering. I en foretrukket utførelse påvises det analytiske resultat i et område av elementet fullstendig innen området hvor et slikt resultat er fremkalt. Anvendelse av spektrofotometri kan være fordelaktig i noen tilfelle da derved effektivt forhindres optiske forstyrrelser fra noen redisier, slik som blodceller, som er blitt gjenværende på eller i sjiktene til elementet. Konvensjonell teknikk med fluorecensspektrofotometri kan også anvendes dersom ønsket. Videre, når blodserum festes etter at forholdsregler er tatt for eliminering av uønsket helblodresidier, kan anvendes transmisjonsteknikker for å påvise og kvantifisere det påviste reaksjonsprodukt ved å rette en stråle av strålingsenergi, f.eks. ultrafiolett, synlig eller infrarød stråling, på en overflate av elementet og måling av mengden energi fra den motsatte overflate av elementet. Generelt er elektromagnetisk stråling i områder fra 200 til 900 nm funnet egnet for slik måling, skjønt hvilken som helst stråling som er gjennomtrengelig for elementet og egnet for å kvantifisere det dannede produkt i elementet, kan anvendes. Forskjellige kalibreringsteknikker kan anvendes for å sikkerstille en kontroll av analysene.

160397

12

Som et eksempel kan en prøve av en analytisk standardoppløsning påføres et nærliggende areal hvor prøvedråpen plasseres for å tillate anvendelse av differensielle målinger ved analysene.

5

Eksempel 1.

10

Ved eksperimentet som beskrevet i dette eksempel ble et fullstendig analytisk element fremstilt og testet for dets evne til å kvantitativt bestemme, som avlest ved refleksjonskoeffesient, nærværet av kalium i en væskeformet prøve.

Elementfremstilling.

Oppløsningen som ble anvendt ved fremstilling av kalium sensitivelement inneholdt følgende komponenter:

15

Komponent	Mengde	Sluttkonsentrasjon (g/100 ml oppløsning)

polyvinylklorid (PVC)	38,4 mg	3,84
dipentylftalat (DPP)	129,6 mg	12,96
valinomycin	4,0 mg	0,4
tetrahydrofuran (THF)	0,87 ml	89,0
total mengde	1,0 ml	100 ml

25

30

1 ml av denne oppløsning ble anbragt på en transparent polyesterfilm, "Gel Bond T^M", ubelagt side og spredd til en dybde av 0,254 mm ved anvendelse av en konvensjonell spatel. "Schotchpar 70" CAB 25 kan anvendes istedet for GEL Bond. Omtrent 30 cm² av 25 mkron tykkelse ble fremstilt. Filmen ble lufttørret ved omtrent 30 minutter.

35

For refleksjonskoeffesient målinger ble polyesterfilmen deretter kuttet i 1 cm segmenter og den ubelagte side vendt ut på en lysspredende polystyrenunderstøttelse ("white Trycite") med "3M" merket dobbeltsidig klebetape. Segmentene ble deretter kuttet for å fremstille et 1 x 0,75 cm reaktivt

element sammensatt av et transparent kaliumsensitivt ionoforsjikt på en polyesterstøttelse med en lysspredende bakgrunn.

Testoppløsning.

Kaliumklorid ble tilsatt til aliquote deler av en oppløsning inneholdende 35,6 mM tris-Cl og 8,89 mM "Erythrosin B" (pH 7,2) for å fremstille kaliumkonsentrasjoner på henholdsvis 0,133, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,75, 0,9 og 1,1. En oppløsning ble også fremstilt som ikke inneholder kalium.

Analytisk prosedyre.

Analysen av hver aliquot del ble utført ved å plassere tilstrekkelig testoppløsning for å fremkalle en forhøyning av væske på elementet. Etter fire (4) minutter ble væsken fjernet ved en svak vannstrøm og elementet ble forsiktig tørket tørt med silkepapir. Den bevarte farge ble kvantifisert fra prosent refleksjonskoeffesient (%R) ved 530 nanometer (nm) ved måling ved hjelp av et refleksjonsspektrofotometer. Avlesninger tatt på testoppløsninger med 0,2 og 0,5 mM kaliumkonsentrasjoner ble anvendt for å kalibrere spektrofotometret.

Resultater.

Avlesningene som ble oppnådd ved denne analytiske prosedyre var i form av %R enheter som ble matematisk omdannet ved hjelp av Kubelka-Monk-ligningen og kalibreringsverdiene til kaliumkonsentrasjons (K^+)enheter, disse avlesninger og respektive iaktatte konsentrasjoner har vært som angitt i tabell 1.

160397

14

Tabell 1

	Virkelig K ⁺ (mM)	(%R)	Iakttatt K ⁺ (mM)
5	0	62,0	0,03
	0,133	40,5	0,19
	0,2	36,7	0,24
	0,3	30,7	0,35
	0,4	27,1	0,44
10	0,5	24,9	0,51
	0,6	23,0	0,58
	0,75	19,4	0,76
	0,9	18,4	0,83
	1,1	15,9	1,02

15

Konklusjon.

De resulterende data viser at det komplette analytiske element fremskaffer en kvantitativ påviselig reaksjon for kaliumkonsentrasjonen for hver av de testede aliquote deler.

20

Eksempel II.

25

Dette eksempel illustrerer at elementet inneholdende det ionofore valinomycin er selektiv for kalium og ikke påvirkelig av natrium, således fremskaffes en differensiell test, i dette eksperiment avlest ved absorpsjon, av disse vanlig forekommende ioner i biologiske væsker.

30

Elementfremstilling.

Kaliumspesifikelementet inneholdt de samme komponenter og ble fremstilt som beskrevet i eksempel I, med unntagelse av at det ikke var festet til en refleksibel understøttelse.

35

Testopløsninger.

Kaliumklorid og natriumklorid ble tilsatt til aliquote deler av en oppløsning inneholdende 5 mM "Erythrosin B" og 50 mM tris-acetat (pH 7,2) for fremskaffelse av kalium og natriumkonsentrasjoner som angitt i tabell 2.

Tabell 2.

<u>Oppløsning</u>	<u>K[±] (mM)</u>	<u>Na[±] (mM)</u>
1	0	4
2	0	10
3	0	20
4	0	50
5	0	100
6	2,2	0

Analytisk prosedyre.

Analysene av de ovenfor fremstilte testopløsninger ble utført ved samme prosedyre som anvendt i eksempel I, med unntagelser av at bibeholdt farge ble kvantifisert fra ekstinksjon, heller enn ved refleksjon, og at avlesningen ble tatt ved 553 nm. Tre målinger ble gjort ved hvert nivå og gjennomsnittet ble bestemt som angitt nedenfor.

Resultater.

Avlesningene som ble fremskaffet ved denne analytiske prosedyre var i form av ekstinksjonsenheter som ble matematisk omdannet til kaliumkonsentrasjons (K⁺) enheter, ved anvendelse av første og siste inngang som kalibreringsverdier. Disse avlesninger og respektive iaktatte konsentrasjoner var som angitt i tabell 3.

Tabell 3

<u>Virkelig</u> <u>K⁺ (mM)</u>	<u>Aktuell</u> <u>Na⁺ (M)</u>	<u>Ekstinksjon</u> <u>(553 nm)</u>	<u>Iaktatt</u> <u>K⁺ (mM)</u>
0	4	0,063	0
0	10	0,062	0
0	20	0,063	0
0	50	0,060	- 0,01
0	100	0,057	- 0,03
2,2	0	0,547	2,2

160397

16

Konklusjon.

De resulterende data viser at det komplette analytiske element fremskaffer en kvantitativ påviselig reaksjon spesifikk for kaliumkonsentrasjon på hver av de aliquote deler som ble testet, uavhengig av natriumionekonsentrasjonen.

Eksempel III.

Ved dette eksperiment som beskrevet i dette eksempel ble gjort en tilsetning av mykningsmidler ved fremstilling av det ionofore sjikt.

Elementfremstilling.

Oppløsningen som ble anvendt ved fremstilling av det kaliumspesifikke element inneholdt følgende komponenter:

<u>Komponent</u>	<u>Mengde</u>	<u>Sluttkonsentrasjon</u> <u>(g/100ml oppløsning)</u>
PVC	40 mg	4
Plastifiserer	100 mg	10
Valinomycin	1,5 mg	0,15
THF	0,9 ml	90
Total verdi	1 ml	100 ml

Anvendt mykningsmidler var tris-2-etylheksylfosfat (TEP) og di-2-etylheksylsebacat (DHS). Elementet ble fremstilt ved prosedyren som beskrevet i eksempel I.

Testoppløsninger.

Kaliumklorid ble tilsatt til aliquote deler av en oppløsning inneholdende 40 mM tris-Cl og 10 mM Erythrosin B (pH 7,2) for å gi kaliumkonsentrasjoner på 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 og 1,1 mM. En aliquot del ble fremstilt inneholdende intet kalium.

Analytisk prosedyre.

Proseduren var den samme som i eksempel I, med unntak av at bølgelengden ved måling var 540 nm og kalibreringsnivåer var

160397

17

0,4 og 0,8 mM-kalium. Prøver ble utført i triplo og gjennomsnittet ble bestemt som angitt nedenfor.

Resultater.

De gjennomsnittlige ekstinksjonsavlesninger og iakttatte konsentrasjoner avledet derfraer angitt i tabell 4.

Tabell 3.

Virkelig	TEP		DHS	
	Iaktatt		Iaktatt	
K^+ (mM)	%R	K^+ (mM)	%R	K^+ (mM)
0	39,8	-0,23	62,8	0
0,2	33,0	0,18	41,7	0,21
0,4	29,4	0,47	34,1	0,37
0,6	27,5	0,67	28,4	0,55
0,8	25,9	0,86	24,4	0,74
1,1	24,3	1,07	20,3	1,02

Grafiske fremstillinger av data angitt i tabell 4 for TEP og DHP fremgår som henholdsvis fig. 1 og 2.

Konklusjon.

De resulterende data viser at elementene fremstilt for å inneholde det ene eller det andre av de ovenfor angitte mykningsmidler var effektive for kvantitativt å påvise konsentrasjonen av kalium i en prøve med nøyaktighet.

Eksempel IV.

I dette eksempel ble anvendt et utvalg av alternative fargestoffer for å vise et vidt spektrum av påviselige emner som er egnet for anvendelse ved oppfinnelsen.

Elementfremstilling.

Det kaliumspesifikke element inneholdt de samme komponenter og ble fremstilt som beskrevet i eksempel III, med unntagelse av at mykningsmidlet difenylftalat ble anvendt.

160397

18

Testoppløsning.

Fire testoppløsninger ble fremstilt som beskrevet i eksempel III, unntatt at istedet for "Erythromycin B", hver oppløsning inneholdt en av de alternative fargestoffer 2,6-diklorfenol-indofenol (DCPIP), "Orange IV", "Phlocine B" og "Eosin Y".

Analytisk prosedyre.

Den analytiske prosedyre var den samme som i eksempel III med unntagelse av at sammensetninger inneholdende de forskjellige fargestoffer ble avlest med følgende bølgelengder:

"Phlocine B" (550 nm)	"Orange IV" (430nm)
DCPIP (680 nm)	"Eosin Y" (550 nm).

Resultater

Ekstinksjonsavlesningene sammen med kaliumkonsentrasjoner beregnet fra disse vises i tabell 5. Grafiske fremstillinger av sammenheng mellom aktuell og iaktatt konsentrasjoner for testoppløsninger inneholdende "Phloxine B", "Orange IV", "Eosin Y" og DCPIP vises som henholdsvis fig. 3, 4, og 5 og 6.

Tabell 5

Virkelig $\underline{K^+ (mM)}$	<u>Phloxine B</u>		<u>DCPIP</u>		<u>Orange IV</u>		<u>Eosin Y</u>	
	$\underline{\%R}$	$\underline{K^+ (mM)}$	$\underline{\%R}$	$\underline{K^+ (mM)}$	$\underline{\%R}$	$\underline{K^+ (mM)}$	$\underline{\%R}$	$\underline{K^+ (mM)}$
0	59,7	0,06	52,3	-0,16	65,1	-0,1	64,7	0,66
0,2	57,0	0,26	35,3	0,10	49,4	0,17	60,9	0,21
0,4	55,7	0,36	25,5	0,45	42,5	0,41	59,4	0,51
0,6	52,7	0,63	22,0	0,66	38,3	0,57	58,8	0,63
0,8	51,6	0,74	20,3	0,79	34,0	0,84	57,6	0,90
1,1	48,1	1,13	17,0	1,12	30,9	1,08	57,5	0,91

160397

20

Konklusjon.

De resulterende data viser at elementer fremstilt for å inneholde hvilke som helst av de ovenfor angitte påviselige emner er effektiv for kvantitativt å påvise konsentrasjonen av kalium med nøyaktighet.

Eksempel V.

Dette eksempel viser at det analytiske element har en kvantitativ og spesifikk reaksjon for kalium når en forskjellig ionofor ("Kryptofix K 222") ble anvendt.

Elementfremstilling.

Oppløsningen anvendt ved fremstilling av det kaliumspesifikke element inneholder de følgende komponenter:

<u>Komponent</u>	<u>Mengde</u>	<u>Sluttkonsentrasjon</u> <u>g/100 ml oppløsning</u>
PVC	38,40 mg	3,84
DPP	64,80 mg	6,48
"Kryptofix K222"	2,40 mg	0,24
THF	0,935 ml	93,50
Totalverdi	1 ml	100 ml

Elementet ble fremstilt ved prosedyren beskrevet i eksempel I.

Testoppløsning.

Kaliumklorid ble tilsatt til aliquote deler av en oppløsning av 5 mM "Erythrosin B" og 20 mM tris-Cl (pH 7,3) for å frembringe oppløsninger inneholdende henholdsvis 0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 og 30 mM kalium. Et sett av oppløsninger ble fremstilt på samme måte ved anvendelse av natriumklorid istedet for kaliumklorid.

Analytisk prosedyre.

Prosedyren var den samme som i eksempel I, innbefattet anvendt bølgelengde, med unntagelse av at kalibrerings-

oppløsningene inneholdt 0,1 og 1,0 mM kalium. Testene ble utført in triplo og gjennomsnittene ble beregnet som angitt nedenfor.

Resultater.

De gjennomsnittlige refleksjonsavlesninger og iaktatte konsentrasjoner fra disse, av disse elementer til kalium og natriumtestoppløsningene er angitt i tabell 6.

Tabell 6.

Virkelig <u>K⁺ (mM)</u>	ØR	Iaktatt <u>K⁺ (mM)</u>	Virkelig <u>Na⁺ (mM)</u>	ØR	Iaktatt <u>Na⁺</u>
0	56,1	0,04	0	54,6	0,03
0,1	50,6	0,1	0,1	53,4	0,05
0,3	46,1	0,25	0,3	53,3	0,05
1,0	28,1	1,0	1,0	54,3	0,06
3,0	9,97	5,2	3,0	51,5	0,08

Konklusjon.

Elementer inneholdende en hensiktsmessig ionofor, slik som "Kryptofix K222" ionofor, viser en spesifikk og kvantitativ reaksjon på kaliumion.

Eksempel VI.

Dette eksempel viser at det analytiske element har en spesifikk og kvantitativ reaksjon for natriumion når ionoforen "Kryptofix K221" anvendes.

Fremstilling og testprosedyre.

Elementet fremstilt som i eksempel V unntatt for anvendelse av "Kryptofix K211" istedet for "Kryptofix 222".

Analytisk prosedyre.

Prosedyren var den samme som i eksempel I, innbefattet anvendte bølgelengde, unntatt av kalibreringsoppløsninger inneholdt 0,1 og 10,0 nM natrium. Tester ble utført in

160397

22

triplo og gjennomsnittlige verdier bestemt som angitt nedenfor.

Resultater.

De gjennomsnittlige refleksjonsavlesninger og iaktatte konsentrasjoner avledet fra disse, av disse elementer for natrium og kalium testopløsninger er angitt i tabell 7.

Tabell 7

Virkelig		Iaktatt		Virkelig		Iaktatt	
<u>Na⁺ (mM)</u>	<u>%R</u>	<u>Na⁺ (mM)</u>		<u>K⁺ (mM)</u>	<u>%R</u>	<u>K⁺ (mM)</u>	
0	56,4	0,14		0	54,7	0,10	
0,1	56,7	0,10		0,1	56,3	0	
0,3	52,5	0,47		0,3	54,2	0,18	
1,0	47,8	1,4		1,0	54,7	0,10	
3,0	30,2	8,4		3,0	57,9	0	
10,0	28,0	10		10	54,4	0,14	
30,0	18,6	21,5		30	53,4	0,31	

Konklusjon.

Analytiske elementer inneholdende en egnet ionofor, slik som "Kryptofix K211" viser en kvantitativ og spesifikk reaksjon for natriumion.

P a t e n t k r a v

1.

Integrert analytisk element for kolorimetrisk eller fluorimetrisk bestemmelse av konsentrasjonen av litium, natrium eller kalium i en flytende prøve,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det integrerte analytiske element omfatter:

a) et første lag sammensatt av et vesentlig ikke-polart materiale festet til en bærer og inkorporert med en ionespesifikk ionofor, istand til selektivt å danne et kompleks med ionet som skal bestemmes, og i et laminært forhold til det første lag,

b) et andre lag inneholdende et negativt ladet motionsfargestoff til ionet som skal bestemmes.

2.

Integrert analytisk element ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det ikke-polare materialet er sammensatt av en plastifiserer og en ikke-polar polymer.

3.

Integrert analytisk element ifølge et av kravene 1-2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at motionfargestoffet er den negativt ladede form av 3',6'-dihydroksy-2',4',5',7'-tetraiodospiro[isobenzofuran-1 (3H)], 9'-[9H]xanten]-3-on, 2',4',5',7'-tetrabromo-3',6'-dihydroksyspiro [isobenzofuran-1(3H)], 4-[[4-(fenylamino)fenyl]azo]-bensensulfonsyre mononatriumsalt, en diklor indofenol, fluoresin, et derivat av fluoresin, 8-anilino-11-naftalensulfonsyre eller 7-amino-4-trifluormetylkumarin.

4.

Integrert analytisk element ifølge et av kravene 1-3,

k a r a k t e r i s e r t v e d at ionet som skal bestemmes er kalium og ionoforen er valgt blant valinomysin eller 4,7,13,16,21-heksaoksa-1,10-diazabicyklo[8,8,8]heksaoksan, fortrinnsvis valinomysin.

160397

24

5.

Anvendelse av det integrerte analytiske element ifølge et av kravene 1-4 ved bestemmelse av litium, natrium eller kalium i en kroppsvæske.

6.

Anvendelse ifølge krav 5, hvor kroppsvæsken er serum eller plasma.

160397

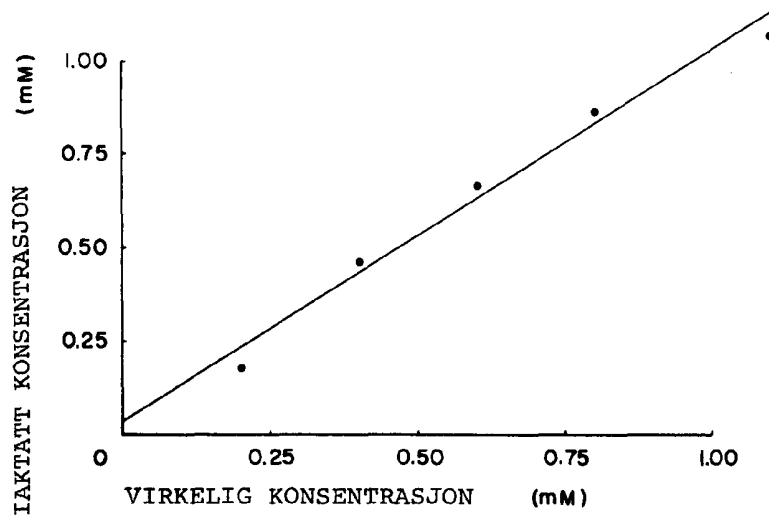


FIG. 1

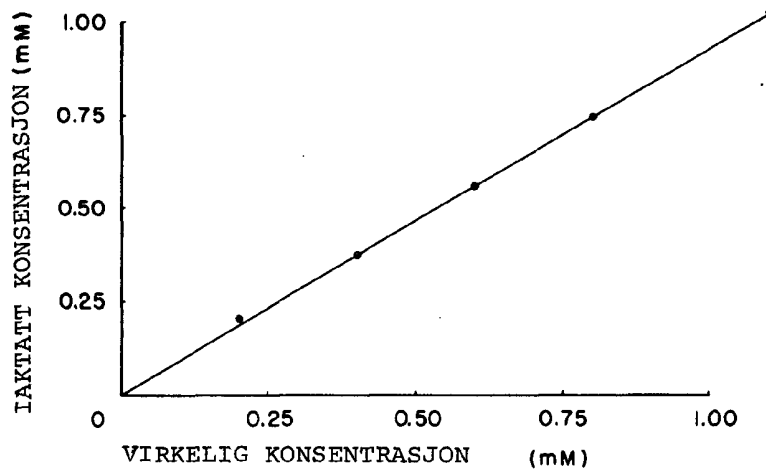


FIG. 2

160397

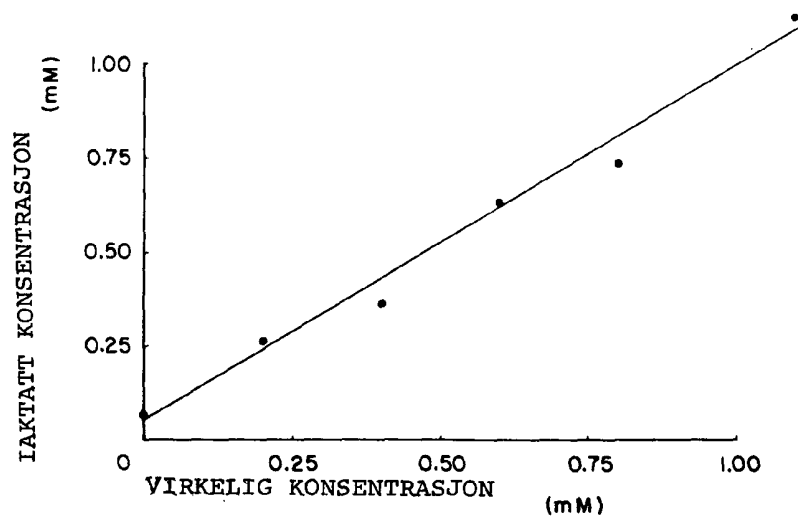


FIG. 3

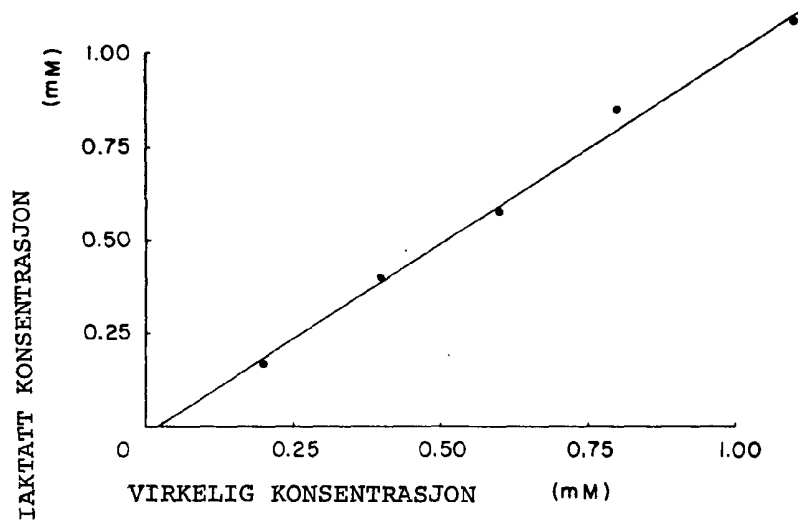


FIG. 4

160397

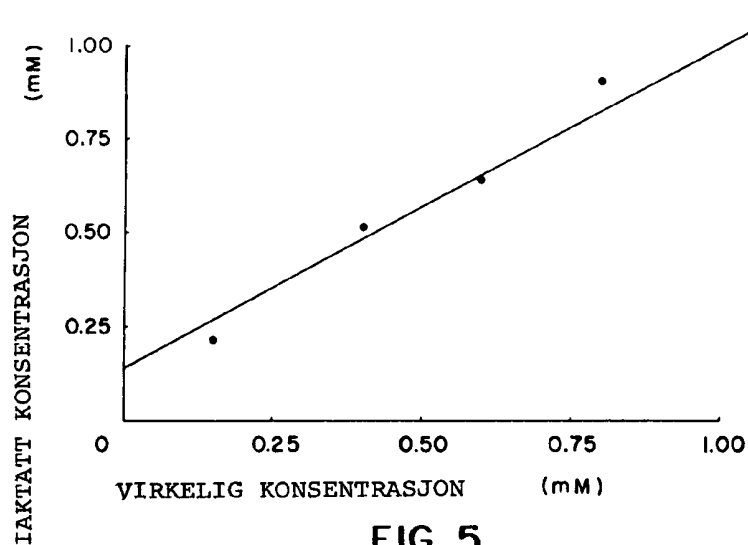


FIG. 5

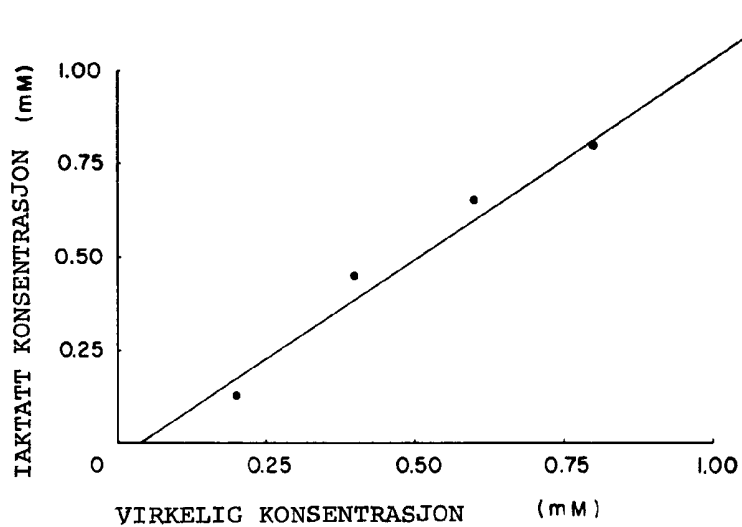


FIG. 6