



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Int. Cl.³: G 01 N 33/48
G 01 N 21/29

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

FASCICULE DU BREVET A5

11

640 947

21 Numéro de la demande: 432/80

73 Titulaire(s):
Battelle Memorial Institute, Carouge GE

22 Date de dépôt: 16.05.1979

72 Inventeur(s):
Iqbal Siddiqi, Veyrier

30 Priorité(s): 17.05.1978 CH 5334/78

74 Mandataire:
Blasco Dousse, Carouge GE

24 Brevet délivré le: 31.01.1984

86 Demande internationale: PCT/EP 79/00035 (En)

45 Fascicule du brevet
publié le: 31.01.1984

87 Publication internationale: WO 79/01081 (En)
13.12.1979

54 Bandes pour analyser des substances dissoutes et son procédé de fabrication.

57 Bande analytique pour la détermination à la touche de substances dissoutes dans des liquides. Cette bande se compose d'un support de base inerte revêtu d'une couche de perles en matière polymérique contenant les réactifs. Le développement de la couleur se fait dans les perles elles-mêmes ce qui entraîne l'amélioration de la sensibilité et de la reproductibilité de la mesure.

Cette bande se prête notamment à l'analyse du glucose en milieu aqueux.

REVENDICATIONS

1. Bande analytique pour l'évaluation de substances dissoutes dans des solutions aqueuses, par exemple des fluides biologiques, au moyen d'une réaction colorée dans laquelle interviennent un ou plusieurs réactifs inclus dans ladite bande, caractérisée en ce qu'elle comprend une bande-support de matière inerte et non absorbante munie d'un revêtement de perles sphériques en matière polymérique où au moins l'un desdits réactifs est incorporé, ledit polymère étant de nature telle que la solution aqueuse à analyser puisse y diffuser quand ladite bande est mise en contact avec ladite solution, ladite réaction colorée ayant ainsi lieu exclusivement dans lesdites perles elles-mêmes.

2. Bande selon la revendication 1, caractérisée en ce que les perles précipitées se composent d'un mélange d'au moins deux sortes différentes de perles, la différence concernant la sorte des réactifs qui y sont incorporés.

3. Bande selon la revendication 1, caractérisée en ce que les réactifs précités sont placés dans les perles précitées en des sites et dans des conditions tels qu'ils soient séparés pendant le stockage et qu'ils ne puissent agir mutuellement les uns avec les autres que lorsqu'ils sont en contact avec la solution à analyser.

4. Bande selon la revendication 3, dont au moins un des réactifs est soluble dans l'eau et au moins un autre est insoluble dans l'eau, caractérisée en ce que lesdits réactifs compatibles avec l'eau sont incorporés dans les perles précitées sous forme d'un certain nombre de microvacuoles remplies de solutions aqueuses desdits réactifs, tandis que lesdits réactifs insolubles dans l'eau sont présents sous forme dissoute dans le polymère lui-même.

5. Bande selon la revendication 4, caractérisée en ce que le polymère des perles est semi-perméable, ce qui permet la pénétration, dans lesdites perles, des substances à analyser lors de l'immersion de la bande dans l'eau et empêcher ainsi que les réactifs inclus dans les perles ne diffusent à l'extérieur de celles-ci pendant le stockage de ladite bande.

6. Bande selon la revendication 4, caractérisée en ce que les microvacuoles précitées sont séparées de l'extérieur par une membrane ayant de 0,1 à 1 μm d'épaisseur.

7. Bande selon la revendication 5, caractérisée en ce que le polymère des perles peut sélectivement filtrer des substances d'un poids moléculaire élevé contenues dans la solution à analyser et pouvant interférer avec la réaction colorée précitée.

8. Bande selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polymère est hydrophile et que l'espace entre les perles précitées du revêtement prélève une quantité donnée par unité de surface de solution à analyser, cette dernière étant retenue entre lesdites perles en raison de la mouillabilité par l'eau de celles-ci.

9. Bande selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'espace précité est délimité par la disposition des perles précitées sur la bande, celles-ci étant placées au voisinage immédiat les unes des autres afin qu'il se forme, sur ladite bande entre lesdites perles, des vides dont la distribution est régulière et qui se remplissent d'un volume constant de la solution lorsqu'on y plonge ladite bande.

10. Bande selon la revendication 1, caractérisée en ce que le support en matière plastique est imperméable à la solution analytique.

11. Bande selon la revendication 1, caractérisée en ce que le support en matière plastique inerte est opaque et réfléchit la lumière.

12. Bande selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polymère des perles est translucide.

13. Bande selon la revendication 12, caractérisée en ce que les perles contiennent, de plus, une substance réfléchissant la lumière, notamment le TiO_2 .

14. Procédé de fabrication des bandes selon la revendication 4, dans lequel les perles sont obtenues par la technique d'émulsion double, ce procédé consistant à :

a) émulsifier une première solution dans l'eau des réactifs précités compatibles avec l'eau dans une solution organique et insoluble dans l'eau d'un polymère,

b) disperser l'émulsion ainsi obtenue dans une seconde phase aqueuse afin de produire ainsi des gouttes de ladite première émulsion dispersées dans ladite seconde phase aqueuse,

c) soumettre ladite dispersion à des conditions d'évaporation afin d'évaporer le solvant de ladite solution organique pour obtenir ainsi une dispersion dans ladite seconde phase aqueuse de perles de polymère contenant des microvacuoles remplies de ladite première solution desdits réactifs solubles dans l'eau, et

d) filtrer et sécher lesdites perles, caractérisé en ce qu'il consiste à appliquer lesdites perles sous forme d'un revêtement continu sur une bande en matière plastique au moyen d'un adhésif, lesdits réactifs insolubles dans l'eau étant dissous dans ledit polymère desdites perles soit en ajoutant lesdits réactifs à la solution du polymère à l'étape a), soit en mettant lesdites perles en contact avec lesdits réactifs avant ou après leur application à ladite bande en matière plastique.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le rapport de la concentration molaire totale des ingrédients dans la première phase aqueuse à la concentration molaire totale des ingrédients dans la seconde phase aqueuse est compris entre 1:5 et 5:1.

Domaine technique

La présente invention concerne des bandes pour analyser des substances dissoutes dans des solutions aqueuses, par exemple des fluides biologiques. Des bandes de cette sorte sont généralement formées d'un matériau laminé mince et poreux, rigide ou flexible où sont incorporés des réactifs, ces réactifs étant responsables du développement d'une réaction colorée typique quand la bande est mise en contact avec les substances à analyser, par exemple en la plongeant dans une solution aqueuse de ces substances. De telles bandes sont particulièrement utiles pour effectuer des déterminations qualitatives ou semi-quantitatives rapides dans des diagnostics médicaux. Un exemple typique d'une telle détermination est celui de la mesure du sang ou du glucose dans les urines.

Il existe déjà de nombreux modèles de bandes commercialisées permettant d'atteindre le but ci-dessus, parmi lesquelles on peut mentionner celles qui suivent.

Technique antérieur

Le brevet US N° 3092463 divulgue l'utilisation de bandes pour analyser certains constituants du sang. Ces bandes sont faites en papier-filtre imprégné de différents réactifs tels que des hydroperoxydes encapsulés, un indicateur (o-tolidine) et un tampon (citrate). Dans les conditions normales de stockage, il ne se produit aucune réaction entre les réactifs et on ne peut observer aucune coloration de l'indicateur, mais quand les bandes sont plongées dans une solution contenant une substance à analyser, par exemple les groupes prosthétiques du sang, les capsules se désagrègent hydrolytiquement avec libération consécutive des hydroperoxydes encapsulés et il se développe une réaction colorée avec l'indicateur. Cependant, ces bandes présentent des inconvénients liés au fait que le papier-filtre (matériau absorbant) qui supporte les réactifs contient, souvent, des impuretés pouvant interférer avec le développement de la couleur et, de plus, la capacité d'échantillonnage de la bande pour la solution à analyser n'est pas bien constante d'un essai à l'autre du fait de différences inévitables du matériau fibreux utilisé pour former celles-ci; ainsi, la méthode n'est que qualitative. Un autre inconvénient est que l'encapsulation est effectuée au moyen d'une substance colloïdale comme de la gélatine, de la gomme arabique ou des polymères carboxyvinyliques qui produisent des capsules à parois minces et très fragiles ayant une stabilité mécanique et, au stockage, sujette à

caution. Un autre inconvénient est que la couleur se développe dans le matériau absorbant lui-même qui est souvent opaque et non homogène, introduisant d'autres sources d'erreurs dans l'évaluation de la coloration.

Le brevet US N° 3926732 enseigne l'usage de bandes analytiques pour la détermination colorimétrique de la catalase dans le lait. Cette méthode est basée sur l'inhibition, dépendant de la catalase, de la réaction colorée qui intervient lors de l'oxydation d'un colorant leuco (o-tolidine) par le peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase. Dans un mode de réalisation de ce brevet US, les bandes comprennent un support inerte solide d'absorption et de diffusion dans lequel sont noyées des microcapsules individuelles, physiquement séparées les unes des autres. Ces microcapsules sont du type semi-perméable dans l'eau [voir «Can. J. Physiol. Pharmacol.», 44, (1966), 115] et le support est formé de fibres de cellulose. Quand la bande est plongée dans la solution à analyser, le peroxyde d'hydrogène engendré par des réactifs d'une première sorte de microcapsules émigre à travers le support et il est partiellement inhibé en fonction de la quantité de catalase à analyser; puis il réagit avec le colorant qui a diffusé hors de microcapsules d'une seconde sorte. La couleur se forme alors dans le support de diffusion, ce qui présente les inconvénients mentionnés ci-dessus. Dans cette méthode, également, la capacité d'échantillonnage de la bande par unité de surface est très difficile à maintenir constante et la méthode n'est pas précise. Un autre inconvénient des bandes ayant des couches de supports fibreux et absorbants est le fait que ces supports ont une structure largement ouverte qui ne retient pas de façon appropriée les substances colorées indésirables pouvant se trouver dans le liquide à analyser et qui peuvent gêner l'observation de la réaction colorée souhaitée. Cela a été partiellement corrigé en utilisant des bandes ayant une couche de supports de faible porosité où les réactifs sont dispersés ou dissous. Des bandes de cette sorte sont révélées par exemple dans le brevet US N° 3630957 mais elles présentent l'inconvénient de ne pas posséder de capacité d'échantillonnage instantané du liquide à analyser. En réalité, quand ces bandes sont immergées dans le liquide, ce dernier pénètre lentement dans les pores du support (qui sont d'environ 0,1-1 µ) et les substances à analyser diffusent vers les réactifs, en abandonnant dans le milieu les matériaux pouvant éventuellement gêner. Cependant, ce procédé peut prendre plusieurs minutes, ou plus, et il n'est pas possible de dire exactement à quel moment le procédé est réellement terminé et le moment où la couleur est suffisamment développée. Par conséquent, l'essai est lent et uniquement qualitatif. On peut remédier à certains des inconvénients ci-dessus en déposant une goutte du liquide à analyser sur la bande. Cependant, c'est également un procédé lent et il n'y a aucune raison de dire que la goutte sera toujours absorbée par une aire connue de la bande; par conséquent, l'essai n'est également que qualitatif.

On a pu remédier partiellement aux inconvénients ci-dessus en utilisant les bandes mentionnées dans le brevet français N° 2336290. Ces bandes comprennent, comme support de diffusion, un polymère synthétique obtenu par la technique de précipitation d'inversion de phase. Selon cette technique, une solution d'un polymère est préparée dans un mélange de deux solvants, l'un étant un solvant de ce polymère moins bon et moins volatil que l'autre. Quand on laisse la solution s'évaporer, il arrive un moment où le bon solvant s'est suffisamment évaporé pour forcer le polymère à précipiter lentement, ce qui, après séchage complet, donne une matière absorbante à structure de gel poreux et ouvert ressemblant à de la fibre de cellulose et ayant des propriétés favorables d'échantillonnage par pompage pour le liquide à analyser. Les réactifs nécessaires pour développer les réactions analytiques colorées des bandes peuvent être incorporés soit par imprégnation, soit par dissolution dans la solution du polymère d'origine. Cela est avantageux, parce que dans le cas de réactifs mutuellement incompatibles, l'un d'entre eux peut être placé dans le corps du polymère lui-même tandis que l'autre peut être imbibé dans la structure poreuse ouverte et au stockage. Ces bandes présentent de nombreux avantages; cependant, la structure intime et la porosité de la matrice dépendent fortement des conditions de préparation et

la reproductibilité des propriétés est difficile à maintenir d'un lot à l'autre. De même, du fait de sa nature assez fibreuse, ce matériau peut introduire des effets de diffusion différentielle sur la solution à analyser, ce qui peut être une source de manque de constance du développement de la coloration. Par ailleurs, la couleur se développe dans tout le corps du support absorbant, ce qui, du fait de problèmes de diffraction de la lumière en rapport avec sa structure, peut limiter la sensibilité de la mesure dans certains cas.

Le brevet US N° 3993451 divulgue des bandes d'essai dont le mode de réalisation comporte une bande d'un papier hydrophile enduit, d'un côté, d'une couche uniforme d'un mélange homogène de deux sortes de particules. Ces particules sont formées d'agglomérats de matériaux absorbants hydrophiles comme de la cellulose en poudre, de l'alumine, du gel de silice et autres imprégnés des solutions des réactifs et ensuite séchés. Une des sortes de particules contient un premier réactif et la seconde sorte contient un second réactif, ces deux réactifs n'étant pas compatibles et étant ainsi maintenus séparés pendant le stockage. Lors d'une plongée dans la solution à analyser, une partie de cette solution est échantillonnée par les matériaux absorbants et les réactifs peuvent contacter la substance à analyser avec un développement consécutif de la réaction colorée. Cette analyse colorimétrique est, par conséquent, très rapide mais l'action d'échantillonnage est assez irrégulière du fait de la nature pulvérulente du matériau absorbant et de la dimension non contrôlée des agglomérats contenant les réactifs.

La présente invention a pour objet de corriger autant que possible les défauts décrits ci-dessus. En bref, une bande analytique idéale doit répondre aux nécessités et propriétés qui suivent:

- a) échantillonner avec précision une quantité donnée d'une solution à analyser par unité de surface de la bande;
- b) obtenir instantanément cet échantillonnage au cours d'un seul mouvement: plongée et retrait;
- c) permettre un contact intime entre la substance à analyser et les réactifs, et arrêter les composants indésirables de la solution pouvant interférer avec les réactions analytiques souhaitées;
- d) permettre un développement rapide et reproductible de la coloration avec une bonne sensibilité et une bonne faculté de mesure (visuelle ou spectrophotométrique);
- e) permettre une bonne séparation, au stockage, des réactifs quand ils sont mutuellement incompatibles;
- f) pouvoir recevoir des réactifs ayant des compatibilités différentes, par exemple, des réactifs solubles dans l'eau et des réactifs liposolubles;
- g) éviter autant que possible les supports inertes pouvant masquer ou interférer avec la réaction colorée;
- h) offrir des voies simples et économiques de fabrication;
- i) être suffisamment résistante du point de vue mécanique pour résister à une manipulation négligente (rupture par abrasion), et
- j) avoir une longue durée de conservation, c'est-à-dire faire en sorte que les réactifs soient bien conservés et protégés contre l'évaporation ou la décomposition.

Exposé de l'invention

La bande d'essai selon l'invention constitue un moyen se rapprochant fortement des conditions requises ci-dessus. Cette bande comporte essentiellement un substrat porteur en matière absorbante et non poreuse, tel qu'une feuille en matière plastique ou une bande enduite (au moins d'un côté) d'une couche continue de microsphères ou perles faites en un polymère hydrophile, les réactifs nécessaires pour obtenir les réactions analytiques colorimétriques souhaitées étant incorporés dans ces perles. Le matériau de base peut également être constitué par une feuille en métal, par exemple une feuille en aluminium ou une feuille de verre. Les perles sont simplement fixées par adhésion à la bande support sans aucune matrice de dispersion et d'absorption dans laquelle les perles sont noyées comme dans les bandes de l'art antérieur où cette matrice sert habituellement de support d'échantillonnage pour les solutions à analyser et également comme milieu de développement de la réaction analytique colorée

mise en jeu. Par conséquent, dans la bande selon l'invention, la coloration apparaîtra dans les perles elles-mêmes, ce qui est très avantageux en ce qui concerne la reproductibilité du développement de la coloration parce que, ainsi, on évite en grande partie que les réactifs se dispersent dans le milieu de façon imprévisible. Par ailleurs, malgré l'absence du support absorbant, la bande selon l'invention présente une capacité très précise d'échantillonnage. De ce point de vue, on notera que le pouvoir d'absorption des perles elles-mêmes (ou plutôt du polymère hydrophile qui constitue les perles) n'a pas d'influence particulière, parce que c'est l'espace vide entre les perles qui joue le rôle de doseur lors de l'échantillonnage de la solution à analyser. Cela est rendu possible car les perles sont faites en un polymère hydrophile qui est mouillable par cette solution quand la bande y est immergée et qui retient par conséquent, instantanément, un volume constant du liquide par unité de surface de la bande, grâce à l'effet capillaire. Par conséquent, en raison des propriétés de mouillabilité du polymère utilisé et selon le diamètre moyen des perles, la quantité du liquide échantillonnée par unité de surface de la bande peut être déterminée et maintenue sous contrôle. Pour cela, les perles auront de préférence un diamètre moyen uniforme et elles seront appliquées sur la bande d'une façon uniforme, par exemple sous forme d'un revêtement monocouche. Dans un tel cas, l'espace entre les perles résultera de la mise en place côte à côte des perles sur la bande, ce qui contribuera à former, entre les perles, des vides distribués régulièrement. La somme de ces vides fournira un volume constant par unité de surface de la bande, le volume étant rempli par la solution à analyser quand la bande y est plongée. Les perles adhérent de préférence à la bande grâce à un adhésif, mais d'autres moyens de fixation comme, par exemple, le fait de ramollir à la chaleur la surface du support en matière plastique de manière que les perles y adhèrent sans autre, sont également possibles. On remarquera, à ce stade, que le principe de la mise en place de perles, côte à côte, sur une bande pour obtenir une action d'échantillonnage sur un liquide n'est pas nouveau. Il a été mentionné, par exemple, dans le brevet français N° 2191734 qui enseigne une bande pour détecter et évaluer des substances en appliquant une goutte d'une solution de ces substances sur la bande et en déterminant, par spectrophotométrie, la coloration développée par une réaction entre les réactifs de la bande et les substances à analyser. Dans la bande de ce brevet, il y a au moins trois couches ayant des fonctions indépendantes: l'une des couches constitue le milieu où le réactif est incorporé, une seconde couche sert d'élément de filtrage et une troisième couche externe sert d'élément pour répartir également le liquide à analyser à la surface de la bande. Cet effet est obtenu en utilisant des perles sphériques de verre ou d'une résine polymérique placées côte à côte sous forme d'une couche de répartition et fixées sur la surface porteuse au moyen d'un adhésif. Cependant, il n'est indiqué nulle part, dans ce brevet, que ces perles puissent également contenir les réactifs analytiques de la bande comme dans l'invention.

De préférence, dans l'invention, la dimension des perles et la nature chimique du polymère sont choisies pour que le liquide échantillonné pénètre dans les perles à une vitesse suffisante pour que la coloration s'y développe à un degré observable en une minute environ. Le polymère doit, par conséquent, avoir une structure appropriée (semi-perméabilité) et, dans ces conditions, les matériaux indésirables éventuellement présents dans la solution seront retenus au dehors des perles, le polymère de celles-ci étant adapté de manière à permettre aux substances à analyser de diffuser dans les perles tout en bloquant d'autres substances ayant des poids moléculaires plus élevés (par exemple, les protéines ou les globules rouges du sang). Les informations relatives à la mise en place des réactifs dans les perles seront indiquées ci-après.

Les perles peuvent toutes être de la même sorte et contenir les réactifs mélangés ensemble, s'ils sont mutuellement compatibles, ou séparés les uns des autres si cela est nécessaire; la méthode pour obtenir cette séparation sera décrite ci-après. Alternativement, les perles peuvent être de deux sortes différentes, une sorte pouvant contenir l'un des réactifs et une autre sorte un autre réactif, ces réac-

tifs n'étant éventuellement pas compatibles l'un avec l'autre. Dans un tel cas, la coloration se développera dans l'une des sortes de perles uniquement, mais cela ne gêne pas car les perles peuvent être suffisamment petites (environ 20 à 200 μ) pour que la zone colorée semble uniforme.

Normalement, pour une bonne observation de la coloration, le polymère utilisé par les perles est, de préférence, transparent ou translucide et, dans un tel cas, la feuille en matière plastique supportant les perles peut être rendue opaque de manière à présenter une meilleure réflectivité, par exemple par incorporation de bioxyde de titane ou d'une autre charge opaque (BaCO_3 , CaSO_4 , pigments pour le papier et autres). On a également trouvé, et cela est surprenant, que si désiré, le TiO_2 pouvait également être incorporé dans les perles mêmes, cela étant possible parce que la zone des perles qui est la plus importante pour l'observation de la coloration est proche de la surface de celles-ci; il en résulte que la présence du pigment blanc dans les perles n'a pas d'effet néfaste sur l'observation de la coloration mais, au contraire, en améliore le contraste.

Le polymère des perles des bandes selon l'invention peut être choisi parmi la plupart des polymères hydrophiles et insolubles dans l'eau, à condition qu'ils puissent se dissoudre dans des solvants organiques non miscibles à l'eau pour des raisons qui seront données ci-après. Ainsi, on peut utiliser des produits dérivés de la cellulose, des polymères hydroxyacryliques, des polymères polyoxyalcoyléniques et des polyamides. Dans le groupe des dérivés cellulosiques, on peut utiliser des esters et éthers de la cellulose comme la méthylcellulose, l'éthylcellulose, la butylcellulose, l'acétate, le propionate et le butyrate de cellulose. La quantité des réactifs que l'on peut incorporer dans les perles est extrêmement variable et, bien entendu, elle dépend de la solubilité des réactifs choisis, de la sensibilité qu'on veut donner à l'analyse et autres exigences qui apparaîtront à ceux qui sont compétents en la matière. Cela sera expliqué dans les exemples qui suivent.

Meilleures manières de réaliser l'invention

La méthode de préparation de perles est dérivée de procédés connus et, plus particulièrement, de la référence qui suit: T.M.S. Chang: «Microencapsulation of Enzymes and Biologicals», de «Methods in Enzymology», 44 (1976), p. 210. La méthode utilisée dépend du produit particulier souhaité. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, une bande analytique a été préparée pour déterminer le glucose dans l'urine. Les réactions chimiques mises en cause étaient l'oxydation classique du glucose en présence de glucose-oxydase et la détection du peroxyde d'hydrogène libéré au moyen d'o-tolidine en présence de peroxydase. Pour faire les perles, on a choisi un ester de cellulose qu'on a dissous dans un solvant organique immiscible dans l'eau, ce solvant contenant de l'o-tolidine. Puis, on a émulsifié dans cette solution organique une phase aqueuse tamponnée contenant les enzymes afin de former ainsi des gouttelettes de la phase aqueuse dans la solution organique. Ensuite, on a dispersé cette émulsion dans une seconde phase aqueuse, de manière à former des gouttes de la solution du polymère dans cette seconde phase aqueuse, chaque goutte contenant, toujours en suspension, les gouttelettes de la première phase aqueuse. Puis on a soumis la dispersion à une évaporation de façon à éliminer le solvant organique et fourni, ainsi, des perles solides d'ester de cellulose contenant de petites vacuoles remplies de la solution aqueuse d'enzymes. L'o-tolidine dissoute dans la résine de polymère a ainsi été empêchée de se mélanger avec les enzymes. Les perles ont été filtrées, séchées et soumises à un calibrage avec des tamis de mailles appropriées, les perles choisies ayant des dimensions de l'ordre de 100 μ . Puis, on a déposé les perles sous forme d'un revêtement continu monocouche sur une bande-support en matière plastique en utilisant un adhésif. Pour cela, tout adhésif traditionnel sous forme liquide est utilisable, tel que, par exemple, des solutions de carboxyméthylcellulose (CMC), d'alcool polyvinylique (PVA), de gomme arabique, d'un caoutchouc de butadiène-styrène (3M), et autres. Afin de lier les perles à la bande en matière plastique, on peut d'abord appliquer,

par pulvérisation ou autrement, une couche très mince de la solution de l'adhésif sur le support puis y disposer régulièrement les perles et les faire adhérer par pression modérée au moyen d'un objet plan. Dans ce cas, les perles ont été appliquées sous forme d'une couche unique, chacune d'entre elles touchant les autres, et cela d'une façon continue. Autrement, on peut mouiller les perles avec une solution diluée de l'adhésif et les appliquer sur la bande en matière plastique avec une raclette ou tout outil semblable. Dans ce cas, on peut envisager des couches de perles plus épaisses (couches doubles ou triples).

Pour les analyses, on plonge la bande dans la solution contenant le glucose et on l'en retire immédiatement. Puis, on la laisse au repos pendant un temps suffisant pour que la solution piégée dans l'espace entre les perles puisse pénétrer dans les perles elles-mêmes et atteindre les vacuoles contenant les enzymes. Là, les réactions se produisent et l'oxygène libéré par la peroxydase agissant sur le H_2O_2 engendré par l'oxydation du glucose convertit l'o-tolidine localisée à proximité des vacuoles en un colorant bleu. Au point de vue pratique, il faut que la coloration se développe assez rapidement, en une minute environ et, dans ce cas, la profondeur à laquelle la substance à analyser peut pénétrer dans le polymère afin d'atteindre les réactifs des perles peut être de l'ordre d'une fraction de micron à 1μ . Par conséquent, l'épaisseur de la membrane semi-perméable protégeant les vacuoles, celles-ci devant être facilement accessibles de l'extérieur, doit, de préférence, être comprise entre $0,1$ et 1μ .

Dans un autre mode de réalisation, une bande a été fabriquée en utilisant deux réactifs liposolubles et mutuellement incompatibles. Dans ce cas, on a préparé une première sorte de perles en dissolvant un polymère et un premier réactif dans un solvant approprié non soluble dans l'eau. On a dispersé cette solution dans une phase aqueuse qu'on a ensuite soumise à une évaporation, ce qui a fourni une dispersion aqueuse de perles de polymère dont les dimensions étaient essentiellement uniformes (environ 60μ) et qui contenaient le premier réactif à l'état dissous. Ces perles de la première espèce ont été alors filtrées, séchées et calibrées. Puis, on a préparé des perles d'une seconde espèce de façon identique, mais avec incorporation du second réactif. Après séchage, les deux sortes de perles ont été mélangées en une proportion telle que des quantités équivalentes et appropriées des réactifs soient présentes dans le mélange, ensuite, on a utilisé ce dernier pour préparer les bandes d'essai comme on l'a décrit ci-dessus dans le cas du premier mode de réalisation. Le domaine d'utilisation des bandes de ces deux modes de réalisation sera décrit ci-après plus en détail.

Dans la préparation des perles qu'on a décrite ci-dessus, de nombreux solvants insolubles dans l'eau mais ayant un bon pouvoir dissolvant pour les polymères hydrophiles choisis peuvent être utilisés; on peut citer des solvants chlorés comme le chlorure de méthylène, le chloroforme et le trichloroéthylène, ainsi que des esters et des éthers comme l'acétate d'éthyle, l'acétate de butyle, le diéthyléther et autres. En général, ces solvants doivent être suffisamment volatils pour être éliminés par évaporation au moyen d'un courant d'air avec léger chauffage ou sous pression réduite.

Pour effectuer les opérations d'émulsion et de dispersion ci-dessus mentionnées, l'usage d'agents émulsifiants est fortement recommandé. La plupart des agents émulsifiants commercialisés ayant des propriétés neutres sont adaptés, comme le sulfate de sodium et de lauryle Tween 20 (fabriqué par ICI) et d'autres.

On peut voir, à la lecture de la description qui précède, que les buts de l'invention ont été atteints de manière satisfaisante grâce aux perles des bandes selon l'invention. Ainsi, grâce à la présence de perles hydrophiles agencées régulièrement sur une pellicule en matière plastique de support imperméable à l'eau et non poreuse, on peut obtenir un échantillonnage rapide et précis du liquide à analyser. Puis, en raison de la structure intime du polymère résultant de la méthode de préparation, les réactifs seront convenablement séparés et protégés pendant le stockage (ce qui est fondamentalement important lorsque l'on stocke ensemble un indicateur oxydable et un hydroperoxyde), et cela, bien que les perles ainsi constituées permettent

un contact intime des substances à analyser avec les réactifs contenus dans les perles, tout en excluant simultanément les matières indésirables. Par ailleurs, la concentration des réactifs à proximité de la surface des perles sera suffisante pour que l'intensité des colorations développées soit bien visible quoique la pénétration de la solution à analyser n'atteigne qu'une faible fraction de l'épaisseur totale des perles. De ce point de vue, on notera, en ce qui concerne les considérations de surface de contact, qu'il y a une différence sensible entre l'art antérieur et la présente invention. Dans l'art antérieur, la surface contenant le réactif observable est une surface plane dont le pouvoir d'absorption et la réflectivité sont en rapport avec des dimensions de surface plane; dans l'invention, la surface n'est pas plane mais est constituée d'une succession de perles sphériques, dont la surface totale est égale à $4 \pi r^2$ (r étant le rayon des perles). On peut facilement calculer que le rapport de l'aire de ces perles à l'aire de la surface supportant les perles est π , c'est-à-dire que l'aire disponible est supérieure à trois fois celle dont on dispose dans les bandes selon l'art antérieur. Du point de vue observation de la couleur également, on peut calculer que l'aire observable à partir d'une série de perles sur une surface plane visible à partir de l'extérieur est de l'ordre de 1,4 fois celle de la surface plane elle-même; par conséquent, la densité de coloration observable et la sensibilité seront augmentées en comparaison avec les bandes selon l'art antérieur.

Il faut également remarquer que, dans la plupart des modes de réalisation de bandes d'analyse selon l'art antérieur, les matériaux absorbants utilisés pour échantillonner la solution à analyser peuvent simultanément recevoir le composé à détecter, le colorant et les autres réactifs. De plus, de tels matériaux ont une surface interne de contact importante et manquent généralement d'homogénéité parce qu'ils ne peuvent pas bien concilier deux propriétés opposées: une forte capacité d'absorption du liquide à analyser et une action d'égalisation sur les taux de migration des divers produits chimiques mis en cause (suppression des effets de chromatographie). Tous ces inconvénients ont été éliminés dans la présente invention. Dans la présente invention, la reproductibilité du développement de la coloration est bonne du fait que les sites colorés seront relativement rapprochés les uns des autres et qu'on évite une diffusion de la couleur en dehors des perles. Une autre caractéristique favorable est la suppression complète de la matrice fibreuse des bandes selon l'art antérieur, ce qui évite les effets de diffusion différentielle en rapport avec les propriétés chromatographiques de tels milieux ou supports fibreux.

Enfin, les bandes utilisées dans l'invention peuvent être très simplement et économiquement fabriquées, car elles ne comportent que deux éléments de construction, ceux-ci étant les perles et les bandes-supports, ces perles ayant une structure solide et résistante en comparaison avec les microcapsules fragiles de l'art antérieur. Dans de telles perles, les réactifs sont bien protégés de l'extérieur et les bandes selon l'art antérieur ont une très longue durée de conservation sans modification de leurs propriétés analytiques.

Les exemples qui suivent illustrent la présente invention. Pour la compréhension de ces exemples, on se référera au dessin dans lequel:

la fig. 1 représente une photographie des perles à un grossissement de 200 fois et montre la distribution de leurs dimensions selon l'exemple 1;

la fig. 2 est une photographie d'un agrandissement de l'une des perles de la fig. 1, et

la fig. 3 est un agrandissement d'une partie de l'une des perles de la fig. 1 et montre la présence de vacuoles normalement remplies de la solution B selon l'exemple 1.

Possibilités d'exploitation industrielle

Exemple 1:

On a dissous 2 g de triacétate de cellulose et 0,25 g d'o-tolidine dans 50 ml de CH_2Cl_2 avec 0,1 g d'un agent tensio-actif (Tween 20 de ICI: monolaurate de polyoxyéthylènesorbitane), ce qui a fourni une solution de polymère (solution A).

On a préparé une solution aqueuse en mélangeant ensemble 3,5 ml d'une solution de glucose-oxydase à 1000 I.U./ml, 60 mg de peroxydase (60 I.U./mg) et 185 mg d'un tampon au citrate (pH: 4,7). Cela a fourni la solution B.

Puis, on a émulsifié la solution B dans la solution A dans les conditions suivantes: température ambiante; agitateur: 200 tr/min; temps: 20 min. L'émulsion se composait de gouttelettes de la solution B (1-5 μ) en suspension dans la solution organique du polymère. Puis, on a dispersé cette émulsion dans une seconde phase aqueuse se composant de 460 mg de sulfate de sodium et de lauryle dans 800 ml d'un tampon aqueux à l'acétate 0,1M, en prenant soin de ne pas agiter trop rapidement afin d'éviter d'obtenir des particules trop petites. Cette dispersion se composait ainsi de gouttes de la solution organique A en suspension dans la seconde phase, chaque goutte contenant, régulièrement distribuées, les gouttelettes de la solution B.

On a chauffé la dispersion sous agitation jusqu'à 35°C pendant 30 min tout en balayant sa surface par de l'air. Le CH_2Cl_2 s'est évaporé, ce qui a provoqué la formation de perles solides de polymère contenant l'o-tolidine et la solution B des enzymes sous forme de petites vacuoles piégées dans le corps microporeux des perles. Après que le CH_2Cl_2 a été totalement évaporé (ce qui a pu être déterminé par la dispersion de l'odeur du solvant), les perles ont été filtrées et séchées. On les a examinées au microscope et on a constaté qu'elles avaient un diamètre compris entre environ 40 et 100 μ , les vacuoles situées à proximité de la périphérie étant assez visibles, la membrane séparant ces vacuoles externes de l'extérieur n'ayant qu'une fraction de 1 μ . Cette configuration est illustrée par les photographies des fig. 1, 2 et 3, qui sont prises au microscope électronique à balayage. Bien entendu, la plus grande partie des vacuoles représentées sur les photographies ont éclaté du fait de la pression développée à l'intérieur lorsque les billes ont été soumises au vide du microscope électronique.

Les perles ont été calibrées sur un tamis en fil métallique de manière à sélectionner celles d'entre elles ayant un diamètre de l'ordre de 100 μ . Puis on a déposé uniformément les perles choisies, sous la forme d'une couche continue (chaque perle touchant pratiquement ses voisines) sur une bande en matière plastique auto-adhésive (type Egafix faite par R. Burkhart, Lucerne, Suisse) afin d'obtenir une bande selon l'invention.

Les bandes obtenues comme on l'a décrit ont été plongées pendant 1 s dans des solutions de glucose à diverses concentrations (indiquées ci-dessus) et on a laissé la couleur se développer pendant 1 min, après quoi on a effectué une mesure de l'intensité de la coloration. La couleur, bleue, était due à l'oxydation de l'o-tolidine par l'eau oxygénée sous l'action catalytique de la peroxydase, cette H_2O_2 ayant été libérée par l'oxydation du glucose catalysée par la glucose-oxydase. Les résultats sont indiqués ci-dessous:

Solutions de glucose (concentration en g/l)	Couleurs des bandes
1	Bleu très clair
2,5	Bleu clair
5	Bleu moyen
10	Bleu foncé

Il est important de noter que, pour des résultats reproductibles, les lectures de couleur doivent être prises à des intervalles donnés après plongée des bandes car, au moment de la lecture, la réaction n'est pas terminée et une partie du glucose n'est pas encore consommée.

Les bandes décrites ci-dessus étaient très stables quand elles étaient stockées dans des conditions sèches normales. La paroi en membrane des vacuoles étant semi-perméable, les enzymes y étaient efficacement piégées, leur poids moléculaire étant trop élevé pour qu'elles puissent filtrer à travers cette membrane semi-perméable.

Exemple 2:

On a préparé des perles comme on l'a décrit à l'exemple 1, mais en omettant l'o-tolidine dans la solution du polymère. L'indicateur a été ajouté ensuite aux perles en imprégnant celles-ci d'une solution d'o-tolidine dans le toluène et en évaporant ensuite ce solvant. Puis, on a préparé des bandes analytiques avec les perles ainsi obtenues de la manière décrite à l'exemple 1. Ces bandes se sont comportées d'une façon identique lors des essais d'utilisation.

Exemple 3:

On a répété le processus de l'exemple 1 en y apportant les modifications suivantes: la solution A du polymère était formée de 4 g de triacétate de cellulose, de 0,5 g de Tween 20, de 1 g de TiO_2 et de 50 ml de CH_2Cl_2 . Les perles ont été préparées et utilisées pour former des bandes analytiques exactement comme à l'exemple 1. Ensuite, ces bandes ont été essayées pour l'analyse de solutions de glucose; elles ont donné des résultats aussi bons que celles de l'exemple 1 mais avec un contraste de teintes amélioré.

Exemple 4:

On a préparé une première solution en mélangeant ensemble: 25 ml de CH_2Cl_2 , 0,5 g de sulfate de sodium et de lauryle; 2 g de triacétate de cellulose; 0,5 g d'hydroperoxyde de cumène; 0,16 g de 6-méthoxyquinoléine; 0,5 g d'éthylène-glycol (stabilisant).

On a émulsifié cette solution dans 400 ml d'un tampon acétate 0,1M (pH: 5,8) contenant 0,5 g de sulfate de sodium et de lauryle. Puis, on a évaporé comme décrit à l'exemple 1, de manière à fournir des perles d'un premier type C qu'on a filtrées et séchées.

On a préparé des perles d'un second type D de la même façon mais en utilisant, comme solution organique, le mélange qui suit: 25 ml de CH_2Cl_2 ; 1 g de triacétate de cellulose; 0,5 g de sodiosulfate de lauryle; 0,25 g d'o-tolidine. La phase aqueuse de la dispersion était la même que ci-dessus.

Ensuite, on a préparé des bandes comme décrit à l'exemple 1 en utilisant un mélange 1:1 en poids des perles C et D. Les bandes d'essai ainsi préparées ont été utilisées pour déterminer des traces de sang dans des solutions aqueuses. Le mécanisme réactionnel est le même que celui décrit dans le brevet US N° 3092463 et il est basé sur la capacité de certains composants du sang (constituants de l'hémoglobine) à catalyser le transfert de l'oxygène de peroxyde à l'o-tolidine avec formation consécutive du colorant bleu. On a obtenu les résultats qui suivent:

Concentration en hémoglobine (mg/l)	Couleur de la bande (après 1 min)
0,923	Bleu clair
6,16	Bleu

Les exemples ci-dessus ne doivent pas être considérés comme limitant l'invention, car de nombreuses autres bandes d'essai peuvent être préparées pour mesurer d'autres substances biologiques comme le galactose, le cholestérol, des composés cétoniques et la bilirubine. Par ailleurs, les bandes peuvent s'appliquer à de nombreux autres domaines où l'analyse rapide d'une solution aqueuse est importante, par exemple pour la synthèse chimique, le placage, le traitement de surface et autres.

De même, des bandes peuvent facilement être faites avec un système de perles d'un côté et un autre de l'autre côté pour mesurer sélectivement deux composants différents dans une solution.

Un facteur est très important et doit toujours être considéré avec soin lors de la fabrication de perles adaptées à la présente invention dans le cas où ces perles contiendraient une solution dans l'eau d'un composant soluble dans l'eau. Afin de pouvoir être rapidement atteintes par la solution à analyser, les vacuoles contenant cette solution dans l'eau doivent être assez proches de la surface des perles mais, bien entendu, pas trop proches, car autrement elles ne pour-

raient résister à un éclatement accidentel. En d'autres termes, la paroi séparant les vacuoles de l'extérieur devra être suffisamment résistante pour se conformer aux conditions de résistance mécanique requises pour les perles, mais suffisamment mince pour permettre la diffusion à travers celles-ci des substances à analyser en un temps raisonnable. Cette épaisseur de paroi peut, en réalité, être contrôlée en ajustant bien les facteurs osmotiques de a) la solution à incorporer dans les perles et b) la phase aqueuse servant de phase de dispersion finale dans la fabrication des perles. De tels facteurs osmotiques seront maintenus dans des limites acceptables si le rapport de la concentration molaire des ingrédients de la première phase aqueuse à celle des ingrédients de la seconde phase aqueuse est compris entre 1:5 et 5:1.

Au-delà de la limite inférieure, le taux de piégeage sera faible et il se pourra que les vacuoles soient distribuées trop loin du pourtour des perles, ce qui ralentirait exagérément le développement de la réaction colorée pour un but pratique. Par ailleurs, si la limite supérieure de cette gamme est dépassée, il y a un risque que la paroi externe des vacuoles devienne trop mince (l'eau externe aura tendance à pénétrer dans les perles pour diluer la solution piégée) et les vacuoles pourront partiellement se rompre pendant la préparation ou au stockage avec une perte possible d'une partie des produits encapsulés.

Exemple 5:

On a préparé une solution organique O de triacétate de cellulose en dissolvant, sous agitation, 2 g de polymère granulé dans 25 ml de CH_2Cl_2 contenant 0,1 g de Tween 20 et 0,25 g d'o-tolidine. Puis on a préparé une première phase aqueuse W1 en mesurant et en mélangeant successivement 3,5 ml d'une solution de glucose-oxydase (1000 UI/ml), 60 mg de peroxydase, 133,8 mg de citrate trisodique et 51,4 mg d'acide citrique, ces deux derniers ingrédients étant d'abord mélangés ensemble avant de les dissoudre. Puis, on a émulsifié la première phase aqueuse W1 dans la solution organique à la température ambiante en agitant vigoureusement jusqu'à ce qu'on obtienne une émulsion régulière W1/0 (gouttes de la phase aqueuse de l'ordre de 1 à 5 dispersées dans la solution organique). Pendant cette opération, un refroidissement peut être nécessaire afin d'éviter un chauffage et une dénaturation possible des enzymes.

Entre-temps, on a préparé trois solutions (W2a, W2b, W2c) en dissolvant les ingrédients qui suivent dans 350 ml d'eau distillée (seconde phase aqueuse).

Ingrédients	W2a	W2b	W2c
Citrate trisodique	6,69 g	13,38 g (0,13M)	26,76 g
Acide citrique	2,8 g	5,4 g (0,07M)	10,8 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,31 g	4,62 g (0,31M)	9,24 g
Sulfate de sodium et de lauryle	202 mg	202 mg	202 mg
Eau jusqu'à	350 ml	350 ml	350 ml

Puis on a dispersé l'émulsion W1/0 dans W2b en ajoutant W1/0 lentement et avec agitation rapide dans W2b.

Après avoir terminé l'addition, on a continué l'agitation et on a graduellement élevé la température à 40°C tandis qu'on faisait passer un courant d'azote sur la surface de la dispersion en agitation jusqu'à ce que le chlorure de méthylène soit enlevé par évaporation. On a essoré la suspension résultante de perles polymériques et on l'a séchée. On a analysé la phase aqueuse filtrée à la recherche de l'enzyme non piégée résiduelle (glucose-oxydase) par les moyens traditionnels. On a trouvé qu'il ne restait que 3% de glucose-oxydase

de départ non piégée dans les perles, ce qui démontre l'efficacité de capture de la méthode.

On a répété l'étape de dispersion ci-dessus avec de nouveaux lots d'émulsions W1/0 en utilisant les phases aqueuses W2a et W2c ci-dessus. Dans ces cas, les rendements d'encapsulation des enzymes ont été, respectivement, de 72 et 82%. Cela indique que l'on obtient les meilleurs résultats quand les concentrations des tampons dans les première et seconde phases aqueuses sont à peu près équivalentes.

Exemple 6:

Préparation d'une bande analytique pour déterminer la présence de la catalase dans le lait de vache

La présence de la catalase dans le lait des ruminants est un symptôme de maladie, et une méthode simple pour détecter l'enzyme peut aider à détecter ces affections en un stade précoce et facile à guérir. Les réactions ayant lieu dans la bande selon l'invention sont les suivantes: scinder le lactose du lait en galactose avec de la galactosidase; oxyder le galactose en présence, comme catalyseur, de galactose-oxydase afin de produire ainsi du peroxyde d'hydrogène; décomposer H_2O_2 en eau et O_2 par la catalase éventuellement présente, et déterminer H_2O_2 résiduel présent par son action sur l'o-tolidine en présence de peroxydase (même réaction colorée que dans les exemples qui précèdent).

On a dissous 4 g de triacétate de cellulose et 0,02 g d'o-tolidine dans 50 ml de CH_2Cl_2 avec 0,4 g de Tween 20. La solution a été répartie en deux portions égales de 25 ml appelées E1 et E2.

Puis on a préparé une première phase aqueuse F1 en dissolvant 10 I.U. de β -galactosidase sans catalase et 150 I.U. de β -galactose-oxydase sans catalase dans 3,5 ml d'un tampon au phosphate 0,1M (pH: 7,5) contenant du chlorure de magnésium (0,003 M de MgCl_2).

Une autre phase aqueuse F2 a été préparée de façon identique avec 100 I.U. de peroxydase dans 3,5 ml du même tampon au phosphate/ MgCl_2 . Puis, on a émulsifié F1 avec E1 dans les mêmes conditions que celles décrites à l'exemple 1 dans le cas de l'émulsification de B dans A, et F2 a été émulsifiée avec E2 de façon identique.

Ensuite, on a mélangé ensemble F1/E1 et F2/E2 (doucement pour éviter que les microgouttes de E1 ne s'unissent à celles de E2), et on a dispersé le mélange dans une troisième phase aqueuse G obtenue en dissolvant les ingrédients qui suivent: 0,2 g de sulfate de sodium et de lauryle; 4,6 g de sulfate d'ammonium; 350 ml de tampon au phosphate 0,1M (pH: 7,5). On a alors soumis la dispersion obtenue à une évaporation sous courant d'azote comme déjà décrit à l'exemple 1, ce qui a fourni des perles de polymère (50-120 μ) contenant de petites vacuoles (1-5 μ) de deux sortes. Les vacuoles de première sorte contenaient la première phase aqueuse F1 et celles de la seconde sorte contenaient la seconde phase aqueuse F2. Les vacuoles des deux sortes étaient distribuées de façon homogène et statistique dans la matière périphérique des perles.

Puis on a calibré les perles et on les a appliquées à la surface d'une bande adhésive comme dans les exemples qui précèdent.

Lorsqu'on a utilisé les bandes ainsi préparées pour analyser le lait d'animaux sains ou malades, le lactose dissous dans le lait a réagi avec les enzymes de F1 en libérant ainsi H_2O_2 . La solution contenant la catalase et H_2O_2 a alors émigré du premier type de vacuoles dans le second type où la portion de H_2O_2 n'ayant pas encore été détruite par la catalase a oxydé la tolidine en présence de la peroxydase. Le développement de la coloration au bout d'une minute était, par conséquent, en raison inverse de la concentration de catalase dans le lait infecté soumis à l'analyse. Dans le cas de vaches saines, la couleur était d'un bleu très sombre. Dans le cas de vaches souffrant de fortes mammites, les bandes restèrent incolores ou d'un bleu très pâle.

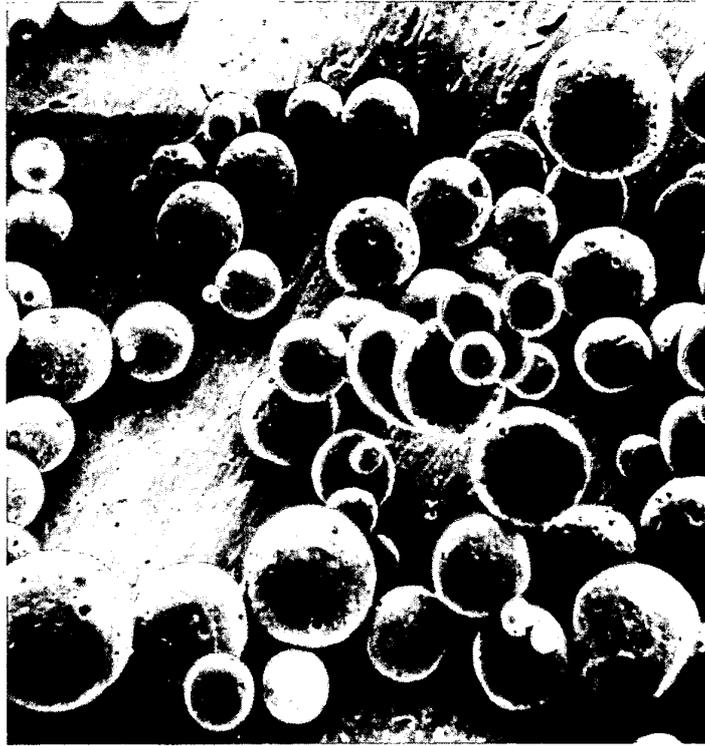


FIG. 1

200 x



FIG. 2

950 x

**FIG. 3**

4 700 x