



# KORRIGERT FORSIDE / CORRECTED FRONT COVER

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **317633**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl<sup>7</sup>

G 01 N 33/66, 33/52

## Patentstyret

|      |                       |                                                                        |      |                            |                        |
|------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|------|----------------------------|------------------------|
| (21) | Søknadsnr             | 19971515                                                               | (86) | Innt.inng.dag og søknadsnr |                        |
| (22) | Inng.dag              | 1997.04.03                                                             | (85) | Videreføringsdag           |                        |
| (24) | Løpedag               | 1997.04.03                                                             | (30) | Prioritet                  | 1996.04.04, US, 627530 |
| (41) | Alm.tilgj             | 1997.10.06                                                             |      |                            |                        |
| (45) | Meddelt:              | 2004.11.29                                                             |      |                            |                        |
| (71) | Søker                 | LifeScan Inc , 1000 Gibraltar Drive, MS 3 D, CA95035-6312 MILPITAS, US |      |                            |                        |
| (72) | Oppfinner             | John L. Smith,, Los Altos, CA, US                                      |      |                            |                        |
|      |                       | Yeung Siu Yu, 3258 Paseo Robles, Pleasanton, CA 95035, US              |      |                            |                        |
| (74) | Fullmektig            | Zacco Norway AS , Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO                  |      |                            |                        |
| (54) | Benevnelse            | Reagenstestremse for bruk i et apparat for bestemmelse av blodglukose  |      |                            |                        |
| (56) | Anførte publikasjoner | EP 256806                                                              |      |                            |                        |
|      |                       | EP 475692                                                              |      |                            |                        |
| (57) | Sammendrag            |                                                                        |      |                            |                        |

Det er beskrevet en reagenstestremse anpasset for bruk i en blodglukosemåler. En prøve av helblod påføres i en overflate av en matriks på remsen og måleren måler reflektansen ved den motsatte overflaten av matriksen ved ca. 635 nm og 700 nm og beregner konsentrasjonen av glukose i prøven fra reflektansen. Den delen av den påførte prøven som penetrerer matriksen og er synlig fra undersøkelsesoverflaten, absorberer ikke i noen vesentlig grad ved 700 nm. Den glukoseholdige prøven interagerer imidlertid med komponentene i den reagensholdige matriksen og medfører en reflektansendring ved 700 nm som simulerer effekten av blodfargen. Som et resultat kan remsen anvendes i målere som måler glukosekonsentrasjonen i helblodprøver i nærvær av optisk synlig hemoglobin.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en tørr reagensremse for måling av konsentrasjonen av en analytt i et biologisk fluid, mer spesielt en reagensremse som kolorimetrisk måler konsentra-sjonen av glukose i helblod.

- 5 Det har vært utviklet mange visuelle testanordninger for måling av konsentrasjonen av visse analytter i biologiske fluider. Disse anordningene har for eksempel målt glukose, kolesterol, proteiner, ketoner, fenylalanin eller enzymer i blod, urin eller spytt.

- Tørrfase reagensremser innbefattende enzymbaserte blandinger blir i stor utstrekning  
10 brukt på sykehus, kliniske laboratorier, legekontorer og hjem for å undersøke prøver av biologiske fluider for glukosekonsentrasjon. Faktisk har reagensremser blitt en daglig nødvendighet for mange av landets flere millioner diabetikere. Siden diabetes kan medføre farlige tilstander i den kjemiske sammensetningen av blod som det kan bidra til synstap, nyrefeil eller andre alvorlige medisinske konsekvenser. For å minimalisere  
15 risikoen for disse konsekvensene har man lært opp personer med diabetes til å måle sitt blodglukosenivå fra to til syv ganger pr. dag, avhengig av typen og alvorlighetsgraden i det individuelle tilfellet. Basert på det observerte mønsteret i de målte glukosenivåene, kan pasienten og legen sammen justere diett, trening og insulininntak for bedre å håndtere lidelsen. Denne informasjonen bør helt klart være tilgjengelig for pasienten  
20 umiddelbart, ved bruk av en måler som er enkel å bruke og et remsesystem som er hurtig, rimelig og nøyaktig.

- Det er kjent reagensremser som inneholder en indikator som gjennomgår en farge-  
endring, avhengig av konsentrasjonen av glukose i et biologisk fluid som har blitt påført  
25 remsen. Selv om noen av disse remsene anvender reduksjonskjemi, innbefatter de mer vanlig et oksiderbart fargestoff eller fargepar. Noen av disse remsene innbefatter et enzym, så som glukoseoksidase, som er istand til å oksidere glukose til glukonsyre og hydrogenperoksid. Det inneholder også et oksiderbart fargestoff og en substans med peroksidativ aktivitet, som er istand til selektivt å katalysere oksidasjonen av det  
30 oksider-bare fargestoffet i nærværet av hydrogenperoksid.

- US-PS nr. 4.935.346 av 19. juni, 1990 til R. Phillips et al., beskriver en måler, remse og fremgangsmåte for bestemmelse av glukosekonsentrasjonen i en prøve av helblod (se også US-PS 5.304.468). Denne metoden medfører ganske enkelt å påføre en prøve av  
35 helblod til en første ("prøve") overflate til en inert porøs matrisk som er impregnert med et reagens. Prøven migrerer mot den motsatte "undersøkelses"-overflaten, mens glukosen reagerer med reagenset og danner et lysabsorberende reaksjonsprodukt. En

avlesning av reflektansen til undersøkelsesoverflaten indikerer glukosekonsentrasjonen. Reflektansmålingene gjøres ved to separate bølgelengder for å eliminere interferenser. En tidsmålekrets startes av en initiell reduksjon av reflektansen forårsaket av fukting av undersøkelsesoverflaten av prøven som har passert gjennom matriksen.

5

US-PS nr. 5.306.623 av 26. april 1994 til Kiser et al., beskriver en visuell blodglukose-testremse som medfører påføring av en glukoseholdig helblodprøve på en side av remsen og utføre glukoseavlesning på den motsatte siden, etter at røde blodceller er fraseparert og prøven har reagert med et reagens i remsen. En anisotropt  
10 polysulfonmembran ble funnet spesielt anvendelig som en enkeltlagsmatriks for reagensen.

US-PS nr. 5.453.360 av 26. september 1995 til Y.Su beskriver et fargepar som er anvendelig i tørreagensremser for deteksjon av analytter så som glukose i biologiske  
15 fluider. Fargeparet består av 3-metyl-2-benzotiazolinonhydrazon og 8-anilin-1-naftalen-sulfonat og brukes som en indikator i en reaksjonskaskade som danner et sterkt oksidasjonsmiddel, så som hydrogenperoksid. En fordel med paret er at det er løslig i en vandig løsning, men blir uløselig ved oksidativ kobling og derved minimaliserer bleking og gir et stabilt endepunkt.

20

En måler som har fått stor anvendelse for bruk for selvmåling av blodglukose er "One Touch II" måleren, som anvender en remse som er beskrevet i US-PS nr. 4.935.346 og 5.304.468 diskutert over. Måleren og remsen gjør det mulig for brukeren å måle glukosekonsentrasjonen i en helblodprøve raskt, enkelt og nøyaktig. Prøven påføres den  
25 ene overflaten til remsen og målingen utføres på den motsatte overflaten. Endel av helblodprøven penetrerer fra prøveoverflaten til undersøkelsesoverflaten og blodfargen kan observeres fra undersøkelsesoverflaten.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en Reagenstestremse for bruk i et apparat for  
30 bestemmelse av konsentrasjonen av glukose i en prøve av helblod, hvilket apparat innbefatter optiske organ for å detektere intensiteten til lys ved bølgelengder på ca. 635 nm og ca. 700 nm, reflektert fra minst en del av en matriks anbragt nær en ende av remsen, kjennetegnet ved at matriksen innbefatter:

a) en prøvemottakende overflate for mottak av helblodprøven og føre endel av  
35 denne mot en undersøkelsesoverflate motsatt denne,

b) en struktur som selektivt stanser passeringen av røde blodceller gjennom matriksen og minimaliserer lysring av cellene i matriksen, hvorved enhver del av

prøven som er synlig fra undersøkelsesoverflaten ikke i noen vesentlig grad absorberer lys ved ca. 700 nm, og

- c) et reagens for indikasjon av glukosekonsentrasjonen ved å danne en reflektans-endring ved ca. 700 nm ved undersøkelsesoverflaten som i det vesentlige er ekvivalent til det som dannes ved absorbans av hemoglobin i blod og en  
 5 reflektansendring ved ca. 635 nm som er indikativ for glukosekonsentrasjonen, der reagentet innbefatter en fargestofforløper som danner en kromofor indikativ for glukosekonsentrasjonen, hvilken kromofor absorberer lys i det vesentlige ved både 635 nm og 700 nm, eller innbefatter en første fargestofforløper som danner en kromofor hvis  
 10 absorbans ved 635 nm er indikativ for glukosekonsentrasjonen og en andre fargestofforløper som danner en kromofor hvis absorbans ved 700 nm simulerer absorbansen til helblod.

- I foreliggende beskrivelse og de medfølgende krav, betyr henvisningen til "prøven som  
 15 er synlig fra undersøkelsesoverflaten ikke i noen vesentlig grad absorberer lys ved ca. 700 nm" at 700 nm's absorbansen fra prøven, sett gjennom undersøkelsesoverflaten, er mindre enn ca. 20% av 700 nm's absorbansen forårsaket av reaksjonen av prøven med reagentet.

- 20 En annen utførelsesform av foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en reagentestremse for bruk i et apparat for bestemmelse av en konsentrasjon av glukose i en helblodprøve. Apparatet innbefatter optiske organ for deteksjon av intensiteten til lys ved bølgelengder på ca. 635 nm og ca. 700 nm, reflektert fra minst en del av en matriks anbragt nær enden av remsen, hvilken matriks innbefatter:

- 25 (a) en prøvemottakende overflate for mottak av helblodprøven og føre endel av denne mot en undersøkelsesoverflate motsatt denne, hvilken undersøkelsesoverflate har en reflektans ved ca. 700 nm som, når undersøkelsesoverflaten blir våt, gjennomgår en endring som i det vesentlige tilsvarer den som dannes ved absorbans av hemoglobin i blod,  
 30 (b) en struktur som selektivt holder tilbake passeringen av røde blodceller gjennom matriksen og minimaliserer lysering av cellene i matriksen, hvorved enhver del av prøven som er synlig fra undersøkelsesoverflaten ikke absorberer lys i noen vesentlig grad ved ca. 700 nm og

- (c) et reagens for indikasjon av glukosekonsentrasjonen ved å danne en reflek-  
 35 tansendring ved undersøkelsesoverflaten ved ca. 635 nm.

Oppfinnelsen tilveiebringer en reagenstestremse som er passende for bruk i en "One Touch" helblodglukosemåler. Siden strukturen av remsen selektivt holder tilbake passering av røde blodceller gjennom matriksen og minimaliserer deres lysring, er glukosebestemmelsen mindre avhengig av hematokritten til helblodprøven.

5

Figur 1 viser en perspektivskisse av en utførelsesform av testremsen i henhold til oppfinnelsen.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en rask og enkelt fremgangsmåte, som anvender et apparat som er enkelt og pålitelig, for bestemmelse av glukose i helblod.

Fremgangsmåten innbefatter påføring av en liten prøve helblod til en overflate ("prøve"-overflaten) til en inert porøs matriks, tilstrekkelig til å mette matriksen. Matriksen er typisk tilstede i et reflektansmåleapparat når blodet påføres. Minst en del av væskeprøven penetrerer matriksen og resulterer i en initiell endring i reflektansen til den motsatte ("undersøkelses")-overflaten. Glukosen i prøvene reagerer med et eller flere reagenser bundet til matriksen og danner et produkt som endrer reflektansen til matriksen. Det tas deretter en avlesning en eller flere ganger etter den innledende endringen av reflektansen for å relatere ytterligere endring av reflektansen ved undersøkelsesoverflaten eller i matriksen til konsentrasjonen av glukose i prøven.

20

Figur 1 viser en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse. En tynn hydrofil matriks-reagenspute 11 er anbragt ved en ende av en plasholder 12 ved hjelp av et klebemiddel 13, som direkte og fast holder reagensputen til holderen. Holderen, som er valgfri, gir fysisk form og stivhet til remsen. Et hull 14 er tilstede i plasholderen 12 i det området hvor reagensputen 11 er festet, slik at prøven kan påføres gjennom hullet 14 til prøvesiden av reagensputen og lys reflektert fra den andre, undersøkessiden.

25

En helblodprøve som skal undersøkes påføres puten 11. Generelt er reagensputens overflateareal ca.  $10 \text{ mm}^2$  til  $100 \text{ mm}^2$ , spesielt  $10 \text{ mm}^2$  til  $50 \text{ mm}^2$ , som vanligvis gir et volum som 5-10  $\mu\text{l}$  av prøven medfører mer enn metning.

30

Ytterligere detaljer vedrørende konstruksjonen av remsen fremgår av de ovenfor nevnte US-PS nr. 4.935.346 og 5.304.468 som herved innlemmes som referanse.

Analysemetoden i henhold til foreliggende oppfinnelse bygger på en endring av absorbanse, målt som diffus reflektans, som er avhengig av glukosekonsentrasjonen som

35

er tilstede i prøven som undersøkes. Denne endringen kan bestemmes ved å måle reflektansendringen over ett eller flere tidsintervaller.

Under bruk blir testremsen først montert i et instrument for avlesning av lysabsorbans, for eksempel fargeintensitet, ved reflektans, før påføring av prøven. Deretter blir en glukoseholdig blodprøve, for eksempel erholdt ved et fingerstikk, påført matriksen til testremsen. Fortrinnsvis vil mengden overskride det som er nødvendig for å mette matriksen i det området hvor reflektansen vil bli målt (d.v.s. ca. 5 - 10 µl). Etter at prøven er påført, starter tidtakingen til målingen automatisk når fluidet penetrerer matriksen og apparatet detekterer den resulterende reflektansendringen i undersøkelsesoverflaten. Reflektansendringen over en forutbestemt tidsperiode, som et resultat av dannelsen av reaksjonsprodukt, blir deretter relatert til glukosekonsentrasjonen i prøven. Reflektansen refererer i denne beskrivelsen og de medfølgende krav både til det synlige bølgelengdeområdet og til infrarød og ultraviolett stråling.

Et passende instrument, så som et diffust reflektansfotometer med passende programvare, kan automatisk avlese reflektansen ved et eller flere tidsintervaller, beregne reflektansendringen og, ved å anvende kalibreringsfaktorer, vise glukosekonsentrasjonen i blodprøven. Detaljer ved et slikt instrument, innbefattende metodene instrumentet bruker for å omdanne reflektansmålinger til blodglukosekonsentrasjoner, er gitt i US-PS 4.935.346 og 5.304.468. Spesielt er kommersielt tilgjengelige "One Touch" målere passende for bruk i kombinasjon med reagensremsen i henhold til foreliggende oppfinnelse for å måle glukosekonsentrasjoner i helblodprøver. Disse målerne avleser reflektansen til remsens undersøkelsesoverflate ved ca. 635 nm og ca. 700 nm.

Matriksen i henhold til foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis et membran som effektivt separerer røde blodceller og hemoglobin fra helblodprøven og gir et glukoseholdig plasma. Separasjonen skjer når prøven beveger seg gjennom membranen fra prøveoverflaten til undersøkelsesoverflaten. En membran som kan utføre denne separasjonen kan ha porer som innfanger røde blodceller, generelt med porestørrelser i området fra ca. 0.1 µm til ca. 5 µm. Fortrinnsvis er membranen anisotrop, med et område av porestørrelser, mest foretrukket et bredt område av porestørrelser. Når matriksen innbefatter en anisotrop membran, er prøvesiden fortrinnsvis den siden med større porer. For eksempel kan det være en gradient av porestørrelser fra ca. 0.1 µm til ca. 150 µm gjennom membranen. På den store poresiden er porestørrelser fortrinnsvis i området fra ca. 30 µm til ca. 40 µm. På den siden av membranen hvor porene er minst

(d.v.s. undersøkelsesoverflaten) er tomromsvolumet relativt lite og materialet til membranet er generelt forholdsvis tett, innen et lag som typisk kan utgjøre ca. 20% av membranens tykkelse. Innen dette laget er porestørrelsen fortrinnsvis i området fra ca. 0.1 til ca. 0.8  $\mu\text{m}$  med en nominell porestørrelse, fortrinnsvis ca. 0.3  $\mu\text{m}$ .

5

Når helblodprøven er påført prøvesiden, treffer prøven gradvis mindre porer når den penetrerer membranen. Eventuelle faste stoffer så som røde blodceller når en posisjon i membranen, generelt nær prøveoverflaten, hvor de ikke kan penetrere ytterligere.

Membranet vil ikke bare innfange røde blodceller nær prøveoverflaten, men også  
10 minimalisere lysring av cellene, slik at enhver del av prøven som er synlig fra undersøkelsesoverflaten ikke i noen vesentlig grad absorberer lys ved ca. 700 nm. Resten av prøven, som fremdeles inneholder oppløst glukose, penetrerer gjennom til undersøkessiden. Når den passerer gjennom membranet, vil glukose i prøven reagere med reagen-sen og medføre at det dannes et lysabsorberende fargestoff nær  
15 undersøkessiden som derved i betydelig grad påvirker reflektansen fra undersøkelsesoverflaten. Den aniso-trope naturen til membranet og/eller bruk av en separasjonskomponent (diskutert under) muliggjør relativt raske strømningshastigheter gjennom membranet, selv om det skjer en separasjon av faste stoffer.

20 Matriksen er en hydrofil porøs membran hvortil reagensene kan være kovalent eller ikke kovalent bundet. Matriksen tillater gjennomstrømning av et vandig medium. Den tillater også binding av proteinblandinger til matriksen uten i vesentlig grad å påvirke den biologiske aktiviteten til proteinet, for eksempel enzymatisk aktivitet til et enzym. I den grad proteinene blir kovalent bundet, vil matriksen ha aktive steder for kovalent  
25 binding eller kan være aktivert på en tidligere kjent måte. Sammensetningene av matriksen er reflektiv og den har en overflatetykkelse som tillater dannelse av et lysabsorberende fargestoff i tomromsvolumet eller på overflaten som i vesentlig grad påvirker reflektansen fra matriksen. Matriksen kan ha en jevn sammensetning eller et belegg på et substrat som gir den ønskelige struktur og fysiske egenskaper, så som  
30 hydrofilitet.

Polysulfoner og polyamider (nyloner) er eksempler på passende matriksmaterialer. Andre polymerer med sammenlignbare egenskaper kan også brukes. Polymeren kan være modifisert til å tilføre andre funksjonelle grupper som gir ladede strukturer, slik at  
35 overflaten til matriks kan være nøytral, positiv eller negativ.

En foretrukket fremgangsmåte for fremstilling av det porøse materialet som utgjør matriksen er å støpe polymeren uten en bærende kjerne. En slik matriks er for eksempel en anisotrop polysulfonmembran tilgjengelig fra Memtec, Inc., Timonium, MD.

Begrepene "matriks" og "membran" brukes om hverandre her. Hvert begrep er forstått ikke å være begrenset til et enkelt lag og kan for eksempel innbefatte et absorberende lag. En matriks med en tykkelse på mindre enn 500 µm brukes vanligvis, men ca. 115 til 155 µm er foretrukket. En tykkelse på ca. 130 til 140 µm er mest foretrukket, spesielt når matriksen er nylon eller anisotrop polysulfon. Matriksen deformeres generelt ikke ved fukting og opprettholder derved sin opprinnelse form og størrelse og har en tilstrekkelig våtstyrke til å kunne rutinefremstilles.

Membranen har i porene impregnert et undersøkelsesreagens som er istand til å reagere med glukose og danne et lysabsorberende reaksjonsprodukt. Membranen kan være behandlet ved reagenser ved å dyppe det i en blanding av komponentene og derved mette membranen. Overskuddsreagens kan fjernes mekanisk, for eksempel ved hjelp av en luftkniv, skalpell eller glasstang. Membranen blir deretter tørket. Reagensene har en tendens til å konsentrere seg nær den siden av membranen med små porer (undersøkessiden). Andre metoder som er passende for påføring av reagens til membranen vil være innlysende for en fagmann med vanlig kunnskap innen området.

Undersøkelsesreagenset innbefatter en komponent for å omdanne glukose til hydrogenperoksid og en komponent for å detektere hydrogenperoksid. Reagenset kan eventuelt ytterligere innbefatte en separasjonskomponent som medfører at faste stoffer, så som røde blodceller, blir fanget i matriksen og effektivt fjerner faste stoffer fra helblodet. Ytterligere komponenter kan også innbefattes som beskrevet under.

Foretrukne komponenter for å omdanne glukose til hydrogenperoksid innbefatter glukoseoksidase, et enzym som vanligvis erholdes fra *Aspergillus niger* eller penicillin. Glukoseoksidase reagerer med glukose og oksygen og danner glukonolakton og hydrogenperoksid. Optimal glukoseoksidasekonsentrasjon avhenger av sammensetningen til indikatorsystemet, men generelt er glukoseoksidase i området fra ca. 500-10.000 U/ml generelt passende, mer foretrukket fra ca. 700-2.000 U/ml. Generelt vil høyere konsentrasjoner av glukoseoksidase medføre at reaksjonen forløper raskere og lavere konsentrasjoner, langsommere. Optimal konsentrasjon kan bestemmes ved rutineforsøk.

Hydrogenperoksidet dannet på denne måten reagerer med komponenten for deteksjon av hydrogenperoksid, som innbefatter en peroksidase som selektivt katalyserer en reaksjon mellom hydrogenperoksidet og en indikator. Peroksidasen anvender hydrogenperoksid som et oksidasjonsmiddel som er istand til å fjerne hydrogenatomer fra forskjellige substrater. En passende peroksidase kan inneholde ferriprotoporfyrin, et rødt hemin 5 erholdt fra planter. Peroksidaser erholdt fra dyr, for eksempel fra bukspyttkjertelen til dyr, er også passende. Pepperrotperoksidase (HRPO) er spesielt foretrukket som en bestanddel for komponenten for deteksjon av hydrogenperoksid. Hydrogenperoksidet, fortrinnsvis katalysert av en peroksidase, reagerer enten direkte eller indirekte og danner 10 et indikatorfargestoff som reduserer 635 nm reflektansen ved undersøkelsesoverflaten. Undersøkelsesoverflaterreflektansen måles ved to bølgelengder - ca. 635 nm og ca. 700 nm.

Reflektansmålingene utføres i en tidsstyrt sekvens. Sekvensen starter ved reflektans-reduksjonen ved 635 nm som er resultatet av ankomsten av en del av prøven på 15 undersøkelsesoverflaten. Vi betegner denne tidsinitieringen som "reflektansveksling". Reflektansen ved 700 nm måles 15 sekunder senere. Ved dette tidspunkt vil blodet ha mettet reagensputen og interaksjonen mellom den glukoseholdige blodprøven og den reagensholdige membranen ville ha medført en reduksjon av reflektansen ved 700 nm, 20 som i det vesentlige er ekvivalent med reduksjonen dannet av blodfargen som er synlig ved undersøkelsesoverflaten. Selv om enhver prøve som er synlig fra undersøkelsesoverflaten derved ikke absorberer lys i noen vesentlig grad ved 700 nm, vil måleren detektere reduksjonen i 700 nm refleksjon som den forbinder med absorbansen til blodfargen, og dette vil medføre at den utfører reflektansmålinger ved ca. 635 nm. 25 Glukosekonsentrasjonen i prøven beregnes fra 635 nm reflektansen ved å anvende 700 nm reflektansen for å kalkulere en korreksjonsfaktor. Legg merke til at siden blod absorberer ved 635 nm, så bør også den blodsimulerende 700 nm absorbatoren gjøre det. Ideelt bør det blodsimulerende materialet ha samme forhold mellom absorbans ved 700 nm og absorbans ved 635 nm som helblod, men for enkelhets skyld refererer vi kun 30 til det blodsimulerende materialets absorbans ved 700 nm. Detaljer ved beregningene innbefattende korreksjon for "blod" -reflektansen ved 700 nm, fremgår av den tidligere nevnte US-PS 4.935.346.

Den reduserte undersøkelsesoverflaterreflektansen ved 700 nm som simulerer 35 blodfargen, kan frembringes på fire alternative måter. For det første kan membranen inneholde en komponent som absorberer 700 nm bestråling og undersøkelsesoverflaten kan være i det vesentlige opak inntil den blir mer transparent for 700 nm's lys når den er

fuktig. Komponenten som absorberer ved 700 nm kan for eksempel være et nonwoven som ikke er synlig fra den tørre undersøkelsesoverflaten. Komponenten kan også være en bærer på hvilken membranen er støpt, et belegg på prøveoverflaten til membranen eller lignende.

5

For det andre kan membranen innbefatte et vannløslig fargestoff som har lysabsorbans ved 700 nm som i det vesentlige øker når fargestoffet går i løsning. For eksempel kan fargestoffet innledningsvis være i form av finfordelte vannløslige krystaller, påført membranen som dispergert faststoff som har et hvitt utseende og som i det vesentlige  
10 ikke gir noen absorbans ved 700 nm. Den vandige prøven oppløser fargestoffet hvorved det blir farget og absorberer ved 700 nm. Et eksempel på et slikt fargestoff er kopperftalocyanin.

For det tredje kan interaksjonen mellom glukose og reagenset i membranen resultere i  
15 en kromofor som absorberer lys ved både 635 nm og 700 nm, og derved indikerer glukose-konsentrasjonen og samtidig simulerer nærværet av blod.

Til slutt kan blod-reagensreaksjonen gi to kromoforer, en som absorberer ved 635 nm og den andre som absorberer ved 700 nm. Videre siden kun tilstrekkelig 700 nm's  
20 reflektansreduksjon er nødvendig for å simulere nærværet av blodfarge, er det fortrinnsvis tilstede kun en liten mengde av kromoforen som absorberer ved 700 nm. I de to første tilfellene hvor 700 nm absorbansen (d.v.s. redusert reflektans) er resultatet av en annen membrankomponent, krever ikke 700 nm absorbansen noen kromofor.

25 I det tredje og fjerde tilfellet skjer reduksjonen av 700 nm reflektansen ved en kromofor. Det tredje tilfellet krever at glukose-reagensreaksjonen danner en kromofor hvis absorbans ved 700 nm simulerer helblod og hvis absorbans ved 635 nm i tillegg måler glukosekonsentrasjonen i blodet. Spesielt størrelsesordenen til reflektansreduksjonen ved 635 nm, justert som beskrevet i US-PS 4.935.346, ved en passende tid etter  
30 innledning av tidsregistreringssekvensen, er et mål på glukosekonsentrasjonen i helblod-prøven. Fargepar som er passende som indikatorer innbefatter fire aminoanitpyren (AAP) og kromotropisk syre; AAP og 8-anilin-1-naftalensulfonat (ANS); AAP og N-etyl-N-(2 hydroksey-3-sulfopropyl)-m-toluidin (TOOS); 3-metyl-2-benzotiazolinon-hydrazon hydroklorid (MBTH) og ANS; og MBTH kombinert med sitt  
35 formaldehydazin.

Det siste tilfellet medfører separate kromoforer, en som indikerer glukosekonsentrasjonen ved utvikling av absorbans ved 635 nm som er et mål på glukosekonsentrasjonen i blodprøven og den andre for å simulere blod (ved tilpasning til helblodets absorbans ved 700 nm). En passende fargestoffforløper for å indikere glukosekonsentrasjonen er  
5 MBTH kombinert med 3-dimetylbenzosyre (DMAB).

Det blodsimulerende fargestoffet kan dannes på flere forskjellige måter. For det første kan det dannes ved en redoksreaksjon, tilsvarende det som danner absorbansen ved 635 nm som indikerer glukosekonsentrasjonen. Eksempler på slike fargestoffer er MBTH  
10 kombinert med primaquin difosfat (PDP), AAP kombinert med PDP, og kombinasjoner derav. For det andre kan det blodsimulerende fargestoffet dannes ved en pH-endring. Den høye pH til blod betyr at reagensens pH øker fra ca. 4.2 til ca. 7, eller mer, når blodet penetrerer matriksen. Fargestoffet som utvikler den blodsimulerende fargen i respons til denne pH-endringen, innbefatter alazarinrød S (et anionisk antraquinon-  
15 fargestoff) og fenolrødt (fenolsulfoneftalin). For det tredje kan fargestoffet dannes med en reaksjon med en naturlig forekommende blodbestanddel (annet enn glukose). For eksempel kan metallochromiske fargestoffer utvikle farge ved kompleksing med metaller som er tilstede i blodet. Fenoltaleinkomplekson vil danne blodsimulerende farge ved kompleksing med kalsium i blodet. Rutineforsøk kan gi det passende  
20 fargestoffet eller fargestoffkombinasjonen for å simulere absorbansen av helblod ved 700 nm.

Selv om den anisotrope membranen som er den foretrukne matriksen filtrerer bort røde blodceller og holder dem borte fra undersøkelsessiden, kan undersøkelsesreagenset også  
25 inneholde en separasjonskomponent (se for eksempel tidligere nevnte US-PS 5.306.623 til Kiser et al.) Separasjonskomponenten bør være istand til å danne en relativt klar fargeløs fluid fra fluidet som inneholder røde blodceller, for eksempel helblod, ved å holde tilbake røde blodceller i matriks og fortrinnsvis også holde tilbake eventuelle mindre mengder av fritt hemoglobin. Separasjonskomponentene for bruk i foreliggende  
30 oppfinnelse innbefatter, men er ikke begrenset til polyetylenglykol, poly(metylvinyleter/maleinsyre)anhydrid, polypropylenglykol, polystyrensulfonsyre, polyakrylsyre, polyvinylalkohol og polyvinylsulfonsyre ved en pH på ca. 4.0 til 8.0. Slike separasjonskomponenter er tilstede i matriksen i mengder som vil variere avhengig av deres ladning og molekylmasse, de andre komponentene innbakt i matriksen, matriksens pH og pore-  
35 størrelse og restfuktigheten til matriksen etter tørking. En fagmann innen området vil lett kunne bestemme slike parametere. For eksempel når polypropylenglykol anvendes som separasjonskomponent (f.eks. PPG-410 fra BASF, Wyandotte, MI), er den

fortrinnsvis tilstede i ca. 2-30% masse til volum (w/v), og mer foretrukket 8-10% w/v. Andre separasjonskomponenter kan også anvendes i en konsentrasjon på ca. 2-30% w/v. De polymere separasjonskomponentene kan være impregnert eller innbakt i matriksen eller støpt inn i membranet under fremstilling.

5

Enkelte vannløslige salter kan også frembringe blodseparasjon. Blant salter passende for å separere blodkomponenter er sitrater, formater og sulfater, såvel som visse syrer, så som aminosyrer, sitronsyre, fytiksyre og maleinsyre. (Se for eksempel US-PS 3.552.928, av 5. januar, 1971 til M.C.Fetter.) Separasjonskomponentene er fortrinnsvis innbefattet i undersøkelsesreagenset fordi de øker effektiviteten til membranen ved å sikre at ingen betydelig mengde rødt blod passerer gjennom. De sikrer derved at prøven som er synlig fra undersøkelsesoverflaten ikke absorberer lys i noen vesentlig grad ved 700 nm.

15

Andre komponenter kan innblandes i matriksen for å forbedre fargingen og avlesbarheten til reagensremsen og bevare jevnheten og integriteten til matriksen. For eksempel kan undersøkelsesreagenset innbefatte salter og/eller buffere for å hjelpe til med separasjon av fargestoff i matriksen. Slike buffere kan for eksempel inneholde sitrat, til stede i løsning fra ca. 0.01M til ca. 1.0M, og fortrinnsvis ca. 0.1M. Det kan også anvendes andre buffere.

20

Det kan også anvendes forbindelser som gjør matriksen hydrofil eller forbindelser som kan virke som stabilisatorer så som hydroliserte proteiner. Slike forbindelser innbefatter, men er ikke begrenset til, for eksempel bovinserumalbumin, polypeptid og proteiner med lav molekylmasse tilgjengelig som Crotein SPA (CRODA, Inc. New York, N.Y.). Slike forbindelser brukes i konsentrasjoner på for eksempel ca. 1 mg/ml til ca. 100 mg/ml. I tilfelle med Crotein, er 30 mg/ml foretrukket.

25

Andre stabilisatorer og konserveringsmidler kan også innbefattes i belegget for matriksen. For eksempel kan det anvendes etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), dietylentrifluoracetat (DTPA) og bindende forbindelser. For eksempel ved konsentrasjoner fra ca. 0.01 mg/ml til ca. 10 mg/ml.

30

P a t e n t k r a v

1.

Reagenstestremse for bruk i et apparat for bestemmelse av konsentrasjonen av glukose i en prøve av helblod, hvilket apparat innbefatter optiske organ for å detektere intensiteten til lys ved bølgelengder på ca. 635 nm og ca. 700 nm, reflektert fra minst en del av en matriks anbragt nær en ende av remsen, k a r a k t e r i s e r t v e d at matriksen innbefatter:

a) en prøvemottakende overflate for mottak av helblodprøven og føre endel av denne mot en undersøkelsesoverflate motsatt denne,

b) en struktur som selektivt stanser passeringen av røde blodceller gjennom matriksen og minimaliserer lysring av cellene i matriksen, hvorved enhver del av prøven som er synlig fra undersøkelsesoverflaten ikke i noen vesentlig grad absorberer lys ved ca. 700 nm, og

c) et reagens for indikasjon av glukosekonsentrasjonen ved å danne en reflektans-ændring ved ca. 700 nm ved undersøkelsesoverflaten som i det vesentlige er ekvivalent til det som dannes ved absorbans av hemoglobin i blod og en reflektansændring ved ca. 635 nm som er indikativ for glukosekonsentrasjonen, der reagentet innbefatter en fargestofforløper som danner en kromofor indikativ for glukosekonsentrasjonen, hvilken kromofor absorberer lys i det vesentlige ved både 635 nm og 700 nm, eller innbefatter en første fargestofforløper som danner en kromofor hvis absorbans ved 635 nm er indikativ for glukosekonsentrasjonen og en andre fargestofforløper som danner en kromofor hvis absorbans ved 700 nm simulerer absorbansen til helblod.

2.

Remse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at matriksen innbefatter en anisotrop membran.

3.

Remse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fargestofforløperen er valgt fra fargestoffpar i gruppen bestående av 4-aminoantipyren (AAP) og kromotropisk syre; AAP og 8-anilin-1-naftalensulfonat (ANS) og kombinasjoner derav.

4.

Remse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fargestofforløpet er valgt fra gruppen bestående av 3-metyl-2-benzytiazolinhydrazon-hydroklorid (MBTH) og ANS, MBTH kombinert med sitt formaldehydazin, og  
5 kombinasjoner derav.

5.

Remse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den første fargestofforløperen innbefatter MBTH kombinert med 3-dimetylamminbenzosyre  
10 (DMAB).

6.

Remse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den andre fargestofforløperen er valgt fra fargestoffparene i gruppen bestående av MBTH og  
15 primakindifosfat (PDP), AAP og PDP, og kombinasjoner derav.

7.

Remse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den andre fargestofforløperen er valgt fra gruppen bestående av alazarinrød S, fenolrød og  
20 kombinasjoner derav.

8.

Remse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den andre fargestofforløperen er fenolftaleinkomplekson.

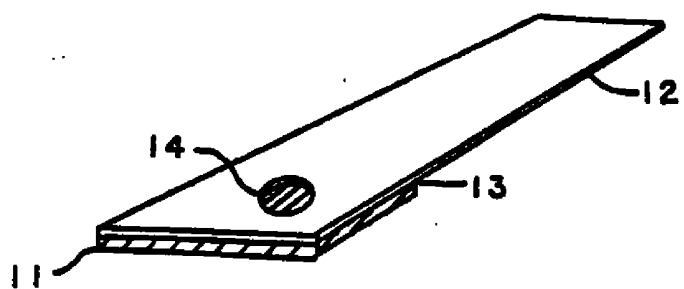


FIG. 1