

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 163264 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1018/80

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/52

(22) Indleveringsdag: 10 mar 1980

(41) Alm. tilgængelig: 16 sep 1980

(44) Fremlagt: 10 feb 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 15 mar 1979 DE 2910134

(71) Ansøger: *BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Sandhofer Strasse 116; 6800 Mannheim-Waldhof, DE

(72) Opfinder: Peter *Vogel; DE, Hans-Peter *Braun; DE, Dieter *Berger; DE, Wolfgang *Werner; DE

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Diagnostisk middel til påvisning af bestanddele af væsker og fremgangsmåde til fremstilling af midlet

(56) Fremdragne publikationer

DK pat. nr. 99301
DE off.g.skrift nr. 2603004
DE freml.skrift nr. 1598153

(57) Sammendrag

1018-80

Opfindelsen angår hidtil ukendte diagnostiske midler til påvisning af korpuskulære, højmolekulære og lavmolekulære stoffer i væsker, fortrinsvis kropsvæsker, som består af vandfaste film, der indeholder de til den pågældende påvisning nødvendige reagenser. Filmene er gjort mere sugedyt-
te, således at de er egnede til bestemmelse af cellulære bestanddele og store molekyler, såsom enzymer, ved at der til den vandige dispersion eller organiske opløsning af filmdannende stoffer, hvorefter den vandopløselige film dannes, er sat fine partikler af faste stoffer, som åbner filmen. Det diagnostiske middel fremstilles ved at blande en opløsning eller dispersion af filmdanneren i en egnet væske med de nævnte filmåbnende partikler og eventuelt de nødvendige reagenser og hjælpestoffer, udforme blandingen på et underlag til en tynd film og afdampe væsken, og derefter eventuelt imprægnerer filmen med reagenser.

DK 163264 B

Opfindelsen angår et diagnostisk middel til påvisning af indholdsstoffer af væsker omfattende en væskefast film, som er fremstillet af en vandig dispersion af filmdannende organisk plast, og hvori der er blandet de til påvisningen nødvendige reagenser samt fyldstoffer i form af uopløselige uorganiske eller organiske partikler.

Påvisning af indholdsstoffer i væsker ved hjælp af prøvestrimler får stadig større betydning. Den giver i mange tilfælde enkle, billige og hurtige påvisningsmetoder. Prøvestrimler er vidt udbredt i urindiagnostikken som kvalitativ og semikvantitativ påvisningsmetode. Specielle prøvestrimler kan også anvendes til påvisning af indholdsstoffer af blod og serum i den medicinske diagnose. Derudover benyttes prøvestrimler også i vidt omfang til undersøgelse af drikkevarer, drikkevand, spildevand og andre væsker, der fremkommer i industrien.

En vanskelighed for den kvantitative udnyttelse af påvisningsmetoderne især til højmolekylære og korpuskulære bestanddele af væsker på prøvestrimmelbasis lå hidtil i, at der næsten udelukkende blev anvendt papir som sugende bærer. Som eksempel skal anføres bestemmelsesmetoden af hæmoglobin i blodet ifølge Tallqvist. Homogeniteten med hensyn til lagtykkelse, struktur og sammensætning, som er nødvendig for kvantitative prøver, er vanskelig at opnå med papir. Ved anvendelse af papir til kvantitative prøver viser det sig endvidere som en ulempe, at en eksakt dosering af prøvematerialet ofte er nødvendig.

Et stort fremskridt for den kvantitative bestemmelse af lavmolekylære stoffer gav anvendelsen af film ifølge DBP 1.598.153. Disse films egenskaber kan tilpasses de pågældende analysemetoder. De forlanger ingen præcis dosering af undersøgelsesmaterialet og reagerer på samme måde med urin, plasma, serum eller fuldblod. Efter en kort indvirkningstid bliver det overskydende materiale blot aftørret. På grund af den ringe porestørrelse af disse film muliggør de en fraskillelse af de dis-

pergerede eller suspenderede bestanddele i opløsningen, der skal undersøges eller af erythrocyterne i blodet fra de lavmolekylære opløste indholdsstoffer.

- 5 Disse film kan til forbedring af deres egenskaber også indeholde ringe mængder af hjælpestoffer henholdsvis pigmenter såsom kridt eller titandioxid til forøgelse af remissionen.

Disse film kan imidlertid ikke anvendes, når der skal bestemmes cellulære bestanddele eller store molekyler, f.eks. enzymer. Sådanne stoffer trænger ikke eller ikke tilstrækkeligt ind i filmen til at bevirke en målelig reaktion. Af denne grund kan der med dette filmprincip f.eks. ikke fremstilles brugbare prøver til påvisning af hæmoglobin, kolesterol i lipoproteiner eller enzymer.

Det har nu fuldstændigt overraskende vist sig, at der fås "åbne" film, hvis der til den vandige dispersion eller organiske opløsning af filmdannende stoffer, hvoraf den vandopløselige film dannes, sættes faste stoffer i form af fine, uopløselige organiske eller uorganiske partikler i bestemte mængder. Midlet ifølge opfindelsen er særegent ved, at med henblik på åbning af filmen for indholdsstoffer med en molekylvægt på over 50.000 og for indholdsstoffer i form af korpuskulære bestanddele ligger vægtforholdet mellem fyldstofmængde og plastmængde i området fra 2:1 til 20:1. Da det faste stof selv ikke "reagerer", er dets sammensætning ikke af afgørende betydning, og der kan f.eks. anvendes cellulose, kiselgur, kiselgel, fældet gips, calciumcarbonat, kaoling, polyamid og glas. Forholdet mellem disse stoffer, i det følgende kaldet "filmåbnere", og filmdanner skal være 20:1 - 2:1. Det afhænger af den anvendte filmåbner og filmdanner og af det tilstræbte anvendelsesformål. Med stigende mængder filmåbner og stigende specifik overflade af det anvendte materiale bliver filmen mere sugedygtig.

Hvis andelen af filmåbner overskrider en bestemt grænse, bliver filmen mekanisk ustabil. Hvis der sættes for lidt filmåb-

ner til filmen, bliver den uigennemtrængelig for højmolekylære eller cellulære bestanddele. F.eks. skal forholdet mellem filmåbner og filmdanner fortrinsvis være 5:1 - 2:1, hvis der anvendes polyamid eller fædet gips som filmåbner og en vandig dispersion af polyvinylpropionat som filmdanner.

Hvis der derimod anvendes kiselgur, skal forholdet fortrinsvis være 2:1.

10 Egnede filmdannere er fortrinsvis organisk plast såsom polyvinylestere, polyvinylacetal, polyacrylestere, polymethacrylsyre, polyacrylamider, polyamider, polystyren, blandingspolymerisater, f.eks. af butadien og styren eller af maleinsyreester og vinylacetat, men der kan dog også anvendes andre film-

15 dannende naturlige og syntetiske organiske polymere samt blandinger af disse, fortrinsvis i form af vandige dispersioner. Filmdanneren kan også være opløst i organiske opløsningsmidler, f.eks. et copolymerisat af vinylchlorid og vinylpropionat i eddikeester.

20 Dispersionerne eller opløsningerne kan udstryges på et underlag til et ensartet lag, som efter tørring giver en vandfast film.

25 Opfindelsen angår desuden en fremgangsmåde til fremstilling af det omhandlede diagnostiske middel. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man blander en opløsning eller dispersion af filmdanneren i en egnet væske med filmåbneren samt eventuelt de nødvendige reagenser og hjælpestoffer,

30 idet vægtforholdet mellem fyldstofmængde og plastmængde ligger i området fra 2:1 til 20:1, udformer blandingen på et underlag til en tynd film og afdamper væsken, hvorpå den opståede film eventuelt imprægneres med reagenser.

35 En særlig fordel sammenlignet med sugedygtigt papir består i, at sådanne film kan fremstilles enklere, mere ensartet og mere reproducerbart. Filmen kan anvendes sammen med underlaget som

bærer eller, med henblik på påvisningsreaktionen, trækkes af denne og eventuelt anbringes på en anden bærer. Bærere til filmene er fortrinsvis plastfolier. Der kan dog også anvendes andre folier, papir, plastplader, glas, metal o.s.v., hvis
5 anvendelsesformålet kræver det.

De til påvisningsreaktionen nødvendige reagenser sættes normalt direkte til dispersionen. Hvis det er fordelagtigt, kan den dannede film imidlertid også imprægneres med dem. Også en
10 forimprægnering af filmåbnerne med reagenserne er mulig. Fremgangsmåderne kan også kombineres på den måde, at f.eks. bestemte bestanddele sættes til dispersionen og andre efterimprægneres på filmen. Derved kan opnås en vis rumlig adskillelse af bestanddelene, hvilket kan føre til mere stabile eller
15 mere reaktionsdygtige prøver. En anden mulighed for at skille receptbestanddele fra hinanden består i at fordele dem på forskellige overtræksmasser og anbringe disse efter hinanden som lag i optimal rækkefølge, således at der opstår et system med flere lag.

20

Hvis det er nødvendigt, kan der tilsættes fortykkelsesmidler, emulgatorer, dispergeringsmidler, pigmenter som f.eks. titandioxid, blødgøringsmidler og befugtningsmidler.

25 Dispergeringsmidler, emulgatorer og fortykkelsesmidler tjener til fremstilling og stabilisering af dispersionerne. Pigmenter såsom titandioxid, der kan være identiske med filmåbneren, forbedrer remissionsegenskaberne af filmene, idet de sørger for mindst mulig transparens og forhøjet remission af filmene.
30 Dette er især fordelagtigt, hvis de derved fremstillede diagnostiske prøvemidler skal benyttes remissionsfotometrisk. Ved hjælp af blødgøringsmidler kan egenskaberne af filmovertræksmasserne samt filmene optimeres. F.eks. kan deres tilstandsstyrke, deres viskositet og deres hæftning til de underlag,
35 som skal overtrækkes, forbedres. Befugtningsmidler anvendes for at opnå en bedre befugtning af filmen med prøvematerialet. De kan samtidig også katalysere reaktioner eller stabilisere

recepter eller gøre reaktionsfarven klarere og mere kontrast-rig.

Selv om de i det foregående beskrevne film fortrinsvis blev
5 udviklet til påvisning af højmolekylære og korpuskulære bestanddele, er de naturligvis også egnede til påvisning og til bestemmelse af lavmolekylære forbindelser. Sammenlignet med filmene ifølge DBP 1.598.153 har de den fordel hurtigere og stærkere at opsuge opløsningen, der skal undersøges, og derved
10 at vise mere intensive reaktioner. De her beskrevne film anvendes fortrinsvis til påvisning af indholdsstofferne af legemsvæsker såsom urin, blod, serum og spyt, men kan dog også i egnet modificering anvendes i andre vandige væsker såsom drikkevand, spildevand o.s.v. og eventuelt også i organiske opløsningsmidler, hvori de er uopløselige.
15

De store fordele består i, at filmen, som optager de nødvendige reagenser, kan indstilles til det tilstræbte anvendelsesformål, idet man vælger de bedst egnede filmdannere, filmåbne-
20 re o.s.v. En videre stor fordel ligger i, at der kan gives afkald på præcise prøvedoseringer, fordi filmen selv doserer prøvematerialet. Overskuddet bliver simpelthen borttørret efter en vis indvirkningstid.

25 I det følgende gives nogle eksempler på midlet ifølge opfindelsen.

Eksempel 1

30 Til fremstilling af en reagensfilm til påvisning af kolesterol i serum fremstilles en dispersion af følgende sammensætning:

	Cellulose	5 g
	Polyvinylpropionat-dispersion (50% i vand)	3 g
	Methylhydroxypropylcellulose	0,042 g
5	Titandioxid-pulver	2 g
	Cholesterolsterase	1,200 U
	Cholesteroloxidase	800 U
	Peroxidase	26,000 U
	Gullussyre	0,032 g
10	En opløsning af 0,2 g 3,3',5,5'- tetramethylbenzidin og 0,17 g dioctylnatriumsulfosuccinat i 0,74 ml acetone	1 ml
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,049 g
15	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	0,167 g
	Destilleret vand	19,5 ml

Blandingen påføres på en polycarbonatfolie i et 300 μ m tykt lag og tørres derpå med varm luft. Det derved fremkomne reagenslag gav med kolesterolholdige sera godt nuancerede blå farvninger i afhængighed af CH-koncentrationen.

Efter justering af det med en lineær skala forsynede remissionsfotometer (Reflomat^R) med den ubenyttede prøvestrimmel til 0-skala-inddelinger og med en sort folie til 100-skala-inddelinger får man følgende måleværdier for de til blåfarvningerne svarende kolesterolkoncentrationer:

	0 mg	0 skala-inddelinger
30	100 mg	6 "
	200 mg	44 "
	300 mg	66 "
	400 mg	76 "
	500 mg	83 "
35	600 mg	88 "
	Sort kontrolfolie	100 "

Eksempel 2

Til en prøve til påvisning af erythrocyter i urin blev der først fremstillet en film af følgende blanding:

5	Polyvinylpropionatdispersion	
	(50% i vand)	50 g
	Kaolin	60 g
	Diocetyl-natriumsulfosuccinat	2 g
10	Destilleret vand	140 ml

Blandingen blev i et 400 μ m tykt lag påført på en polycarbonatfolie og derefter tørret med varm luft. Den derved fremkomne film imprægneres med de nedenfor anførte opløsninger I og II og bliver efter hver imprægnering tørret med varm luft.

Opløsning I

	EDTA $\cdot$ Na ₂	1 g
20	Trinatriumcitrat $\cdot$ 2H ₂ O	15,7 g
	Citronsyre $\cdot$ H ₂ O	3,48 g
	Phosphorsyretrimorpholid	30,5 g
	Benzo-lysegul	0,048 g
	Destilleret vand	190 ml

25

Dertil sættes 3,2 g 2,5-dimethyl-2,5-dihydroxyperoxyhexan i 60 ml methanol.

30

35

Opløsning II

	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin	0,56 g
	Diocetylatriumsulfosuccinat	1,0 g
5	Phenanthridin	1,4 g
	Phenylsemicarbazid	0,06 g
	Toluen	100 ml
	Methoxyethanol	10 ml
	Petroleumsether	90 ml

10

Den derved fremkomne film giver grønne farvninger med erythrocytholdig urin.

Eksempel 3

15

En film til påvisning af nitrit i urin blev fremstillet som følger:

I den nedenfor anførte opløsning a) blev indrørt 10 g cellulose, og der blev frafiltreret og tørret i varm luft.

20

Opløsning a)

	3-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-	
25	[h]-quinolin	0,392 g
	Sulfanilamid	0,344 g
	L-vinsyre	5,00 g
	Methanol p.A.	200 ml

Med den således imprægnerede cellulose blev fremstillet følgende overtræksmasse:

35

	Imprægneret cellulose	10,00 g
	Methylhydroxypropylcellulose	0,09 g
	Polyvinylpropionat-dispersion (50% i vand)	5 g
5	10%-ig opløsning af dioctylnatrium= sulfosuccinat i acetone	3 ml
	Destilleret vand	35 ml

Der blev påført et 400 μ m tykt lag af massen på en polyester-
 10 folie og tørret med varm luft. Den vandopløselige film gav
 røde farvereaktioner med nitriholdige væsker, f.eks. urin
 eller spildevand fra industrien.

Eksempel 4

15

Til påvisning af hæmoglobin i blodet blev fremstillet en rea-
 gensfilm af følgende blanding:

	Cellulose	20 g
20	Polyvinylpropionat-dispersion (50% i vand)	15 g
	Dioctylnatriumsulfosuccinat	0,3 g
	0,5 mol PO ₄ -stødpude, pH = 7	75 ml

25 Blandingen blev i et 200 μ m tykt lag påført på en polyester-
 folie og tørret med varm luft.

Hvis man af en fortyndingsrække af blod med forskelligt hæmo-
 globinindhold lader i hvert enkelt tilfælde en dråbe indvirke
 30 et minut på prøven, får man efter aftørring af dråben med vat
 nuancerede farvninger.

Hvis man måler den opståede farvning på prøvestrømmen på re-
 missionsfotometer (PMQ3 fra Zeiss) ved 540 nm, får man i af-
 35 hængighed af hæmoglobinkoncentrationen følgende måleværdier:

10

	<u>g HB/1</u>	<u>% R</u>
	53	46,1
	100	38,8
5	150	31,7
	201	25,5

Eksempel 5

10 For at konstatere grænserne for fremgangsmåden blev filmåbner og filmdanner varieret i en blanding analog med eksempel 4, og der fremkom film med følgende egenskaber:

15

20

25

30

35

	Filmåbner/filmdanner		Egenskaber ved reaktion med erythrocyterne i blod
	Kiselgur : Polyvinylpropionat		
	0,5 : 1 Sammenligningseksempel		Stabil film. Erythrocyterne trænger kun ind nogle steder.
5	1 : 1 Sammenligningseksempel		Stabil film. Ensartet reaktion af hele filmen.
	4 : 1		Ensartet reaktion af hele filmen. Filmmaterialet bliver delvis løsnat allerede ved aftørringen.
10	Gips : Polyvinylpropionat		
	3 : 1		Stabil film. Ringe farvning.
	4 til 10 : 1		Stabil film. Ensartet dyb farvning.
15	20 : 1		Film der kan aftørres med ringe tryk. Ensartet farvning. Dråber "kromatograferer" på kanten.

P a t e n t k r a v .

1. Diagnostisk middel til påvisning af indholdsstoffer af væs-
ker omfattende en væskefast film, som er fremstillet af en
vandig dispersion af filmdannende organisk plast, og hvori der
er blandet de til påvisningen nødvendige reagenser samt fyld-
stoffer i form af uopløselige uorganiske eller organiske par-
tikler, k e n d e t e g n e t ved, at med henblik på åbning
af filmen for indholdsstoffer med en molekylvægt på over
50.000 og for indholdsstoffer i form af korpuskulære bestand-
dele ligger vægtforholdet mellem fyldstofmængde og plastmængde
i området fra 2:1 til 20:1.

2. Diagnostisk middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den væskefaste film er fastgjort på en bærer.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af diagnostiske midler iføl-
ge krav 1-2, k e n d e t e g n e t ved, at man blander en op-
løsning eller dispersion af filmdanneren i en egnet væske med
filmåbneren samt eventuelt de nødvendige reagenser og hjælpe-
stoffer, idet vægtforholdet mellem fyldstofmængde og plast-
mængde ligger i området fra 2:1 til 20:1, udformer blandingen
på et underlag til en tynd film og afdamper væsken, hvorpå den
opståede film eventuelt imprægneres med reagenser.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at
filmen løses fra underlaget og fastgøres på en bærer.

30

35