



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 164063

(51) Int. Cl.⁸ G 01 N 33/66, 33/52

(21) Patentsøknad nr. **850832**

(22) Inngivelsesdag 01.03.85

(24) Løpedag 01.03.85

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **VEB ARZNEIMITTELWERK DRESDEN,**
Postfach 89/90,
DD-8122 Radebeul, DD.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 10.10.85

(44) Utlegningsdag 14.05.90

(72) Oppfinner **KARL-HEINZ KALLIES, Sebnitz,**
DIETER PLASCHNICK, Wolfen,
PETER MOHR, Hohen-Neuendorf,
HANS-JÜRGEN THIELE, Dresden,
CONRAD JOHANNES PAHLITZSCH, Sebnitz,
LOTHAR KRETSCHMER, Längburkersdorf,
GERT KALLIES, Sebnitz, DD.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 09.04.84, DD, nr. 261762.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FORSØKSSTRIMMEL TIL OPPTAK AV BLODSUKKERDAGS-
PROFILER SAMT ANVENDELSE DERAV.**

(57) Sammendrag Forsøksstrimmel som finner anvendelse i glukose-
diagnostikken til opptak av blodsukker-dagspro-
filen, men også til glukosebestemmelse i urin for å
fastslå den individuelle nyreterskelen hos diabe-
tikere som dagsprofil. En stabil funksjon av for-
søkstrimmelen og tilpasning til kommersielle måle-
innretning oppnås ved hjelp av en filmreaksjons-
folie som er etterbehandlet ved hjelp av kompleks-
dannere og acykliske hydroksyaminer eller amino-
derivater og er forbundet med en bærer.

(56) Anførte publikasjoner Norsk (NO) alment tilgjengelig patentsøknad nr. 840983,
Norsk (NO) utl.skrift nr. 159561,
DDR (DD) patent nr. 140175,
Svensk (SE) utl.skrift nr. 442680, 426624.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en forsøksstrimmel til opptak av blodsukkerdagsprofiler, bestående av en bærer og en filmreaksjonsfolie hvor det er anbragt et glukoseoksydase-, peroksydase- samt o-tolidinholdig enzym-indikator-gelatin-sjikt, eventuelt med tilsats av myknere, fuktemidler, tverrbindingsmidler og/eller fargestoffkoblere og hvor glukosekonsentrasjonen kan bedømmes ved et hvilket som helst tidspunkt i løpet av 30 dager.

Behandlingen av diabetes rettes i stadig økende grad mot innstilling av en normal glukoseverdi. Innstillingen av denne normale glukoseverdien krever en registrering av de individuelle variasjonene i glukosenivå under daglige betingelser, for å kunne overvåke, og eventuelt korrigere, næringsinntak og kroppslig aktivitet i forbindelse med terapien. Mer en 50% av alle diabetikere dør fremdeles av langtidsskader som skyldes en ikke tilstrekkelig stabil stoffskiftesituasjon med hensyn på glukose. Unngåelse av disse skadene, og om mulig en helbredelse av allerede inntrådte skader, kan bare oppnås ved omfattende senkning av glukosenivået i blodet til en stabil tilstand med normal glukoseverdi. Siden kriteriene for denne innstillingen er individuelt forskjellige og påvirkes av de ovenfor nevnte faktorene, er en regelmessig legekontroll av variasjonene i blodsukkerverdiene i løpet av en dag eller 24 timer et viktig grunnlag for behandling og forebyggelse av langtidsskader. Hyppigheten av slike kontroller varierer med diabetikertypen. Avhengig av diabetikertypen anses små dagsprofiler med 5 til 6 bestemmelser i løpet av en dag, eller store dagsprofiler med 11 bestemmelser i løpet av 24 timer, hver uke eller inntil hver 12. uke for nødvendige.

Disse medisinske kravene har hittil på begrenset måte kunne oppnås ved:

1. konservering av en blodprøve som pasienten selv tar og etterfølgende enzymatisk laboratorieanalyse av denne eller

164063

2

2. diabetikeren undersøker selv sin blodsukerverdi med spesielle dertil utviklede forsøksstrimler som muliggjør en halvkvantitativ visuell bestemmelse eller som ved anvendelse av et refleksjonsmåleapparat, muliggjør en kvantitativ bestemmelse.

Ved den første fremgangsmåten må diabetikeren ta opp blodprøven med et kapillar, og plassere hvert kapillar i et rør som inneholder en konserveringsvæske. For denne fremgangsmåten er det utviklet et forsøksutstyr som så sendes til et laboriatorium hvor bearbeidelsen og analysen foregår. De konserverte blodprøvene er holdbare i ca. 10 dager. Fremgangsmåten er omstendelig og dyr og har begrenset anvendelighet.

Med metode nr. 2 er en kvantitativ bestemmelse med tilfredsstillende nøyaktighet mulig dersom det anvendes en reflektometrisk bedømmelse. En dokumentasjon av resultatene er imidlertid ikke mulig p.g.a. fargingens ubestandighet. Denne mangelen nødvendiggjør øyeblikkelig bestemmelse av diabetikeren selv og forutsetter anskaffelse eller tilgjengelighet av et måleapparat til bedømmelse av forsøksstrimlene.

P.g.a. det lave antallet av blodsukkerbestemmelser som, bortsett fra hos gravide, barn eller labile diabetikere, ligger mellom 5 og 11 blodsukkerbestemmelser i måneden eller kvartalet, er utførelsene av bestemmelsene p.g.a. manglende rutine beheftet med en individuell ekstra usikkerhet som gjør det vanskelig for legen å foreta en bedømmelse av verdien. Materialomkostningene kan under disse forhold bare rettferdiggjøres for mindreårige eller gravide diabetikere.

Av disse grunnene holdes en forsøksfremgangsmåte hvor diabetikeren selv foretar en bestemmelse under daglige forhold og legen kan stå for vurderingen av resultatene for

optimal. På denne måten muliggjøres det at hver diabetiker kan foreta en kontroll av blodsukkerprofilen under legekontroll og -bedømmelse.

5 I erkjennelse av problemet med fargelabiliteten på de hittil utviklede forsøksstrimler har det vært arbeidet for å overvinne denne mangelen ved hjelp av enkelt- eller flerlagsbesjiktete filmbærerfolier, som er preparert med gelatin, enzymer, indikatorer og tilsatsstoffer på forskjellige måter. Fordelen ved den oppnådde fargestabiliteten oppveies her av mangelen på adapterbarhet ved 10 refleksjonsmåleinnretningen på grunn av indikatorfunksjonen eller absorpsjonsspektret. Videre påvirkes reaksjonsevnen sterkt av luftfuktighet, varme og lys, dette var forhindret ved den tidligere innretningen. 15

Den i og for seg kjente besjiktningen av filmbærerfolier med enzym-indikator-gelatin ved tilsats av fuktemidler, myknere, fargestoffkoblere og herdemidler viser ved kvantitativ 20 bestemmelse av blodsukker verdien en høy spredning, dvs. utilstrekkelig nøyaktighet, som blant annet er betinget ved en utvaskingseffekt av indikatorsystemet, forskjellige hematokritverdier, forskjellig etterherding av sjiktet, ved lagringspåvirkninger og hastigheten for vannopptak, dvs. 25 svellingen.

Ved den praktiske anvendelsen er det spesielt viktig at absorpsjonsspekteret og indikatorfunksjonen er tilpasset den disponible måleinnretningen og at det kan oppnås en 30 stabilitet som er tilstrekkelig for anvendelsen.

Det er kjent å etterbehandle enzym-indikator-gelatin-sjikt med en vandig oppløsning av krom-III-salt. Ved denne etterbehandlingen forhøyes styrken i fuktig tilstand ved at 35 fuktningsgraden for gelatinet forandres. Denne etterbehandlingen forandrer bare overflateegenskapene og har ingen innflytelse på det funksjonelle forløpet, absorp-

164063

4

1 sjonsspekteret og stabiliteten. Det er også kjent å benytte
enzym-indikator-gelatin-sjikt til glukosebestemmelse, hvor
bifenylderivater anvendes som kromogener med et fikserings-
5 middel, som ved omsetning ved $\text{pH} < 5,0$ danner et semi-
kinonimin-fargestoff som ikke vaskes ut. Fikseringen og
stabiliteten er imidlertid bare garantert når dette pH-området
ikke forskyves på grunn av vasken som skal undersøkes. Ved
10 blod og serum med en pH-verdi på 7,0 og virketid på mer enn
30 sekunder vil imidlertid en slik forskyvning finne sted.
Av denne grunn er nøyaktigheten bare tilstrekkelig i vandig
sure oppløsninger, og de ekstinksjoner og fargedannelser som
oppstår med blod og serum er ikke sammenlignbare.

15 Det er også kjent å påføre to enzym-indikator-gelatin-sjikt
som inneholder forskjellige enzymkonsentrasjoner, til for-
bedring av funksjonsforløpet. Da det også i dette tilfellet
som beskrevet ovenfor anvendes et fikseringsmiddel ved $\text{pH} <$
5,0 til stabilisering forblir problemene med en høy
spredning, innvirkning av hematokritverdien og stabiliteten
20 uforandret.

De beskrevne fremgangsmåter og forsøksstrimler, henholdsvis
besjiktete folier, har alle den ulempe at de ikke kan
tilpasses det refleksjonsmåleapparatet som i 10 år har
25 vært på markedet. For anvendelsen til bestemmelse av dags-
profiler av glukose er de i likhet med de kommersielle
forsøksstrimlene bare delvis egnede.

30 Målet med oppfinnelsen er å tilvelebringe en forsøksstrimmel
hvor diabetikeren plasserer en dråpe blod som etter en tids-
begrenset innvirkning tørkes av og strimmelen sendes deretter
til legen for kontroll og bedømmelse. Forsøksstrimmelen skal
være slik utformet at klokkeslett, dato og navn kan noteres
på hver forsøksstrimmel. Den stabiliteten som tilstrebes
35 skal muliggjøre postforsendelse og garantere en, øyeblikkelig
eller forsinket, nøyaktig glukosebestemmelse.

Fremgangsmåten til fremstilling av forsøksstrimlene er rettet mot å stabilisere funksjonen av filmreaksjonsfolien slik at den under normal betingelse holder seg konstant i minst 4 uker, og at den inntrådte fargereaksjon etter benyttelse ikke bare er stabil til bedømmelse i løpet av 4 uker, men deretter forblir stabil som belegg og eventuelt kan utnytted som fargesammenligning for visuell bedømmelse av enkelte mellomliggende prøver.

Det er videre et mål å innstille forholdet mellom glukosekoncentrasjonen og ekstinksjonen, samt absorpsjonsspektret, slik at en anvendelse av tilgjengelige og kommersielle måleapparater kan finne sted uten komplikasjoner.

Det er et mål å komme frem til en enkel utforming uten komplisert flersjiktsoppbygning for den kjente enzymatiske indikatorreaksjonen med glukose, hvor denne ikke er betinget av det enzym som benyttes eller hvor ekstremt tynne skikttykkelser er påkrevet.

Det er videre et mål å utvikle forsøksstrimlene slik at man ved hjelp av forskjellig justeringsstrimler kan omfatte 2 til 3 forskjellige måleområder for målrettet terapeutisk tyngdepunktskontroll med den samme forsøksstrimmelen.

Det en oppgave ved oppfinnelsen å oppnå de forutsetninger som er nødvendige for blodsukkerdagsprofilen og de krav vedørende stabilitet av forsøksstrimlene, stabilitet av fargingen, nøyaktigheten av resultatene, tilpasning for tilgjengelige refleksjonsmåleinnretninger og mulighet for innstilling av forskjellige måleområder uten komplisert, flersjiktig oppbygning eller spesielt tynnbesjiktning og derav følgende ulemper ved funksjonen eller absorpsjonsspekteret.

Ifølge oppfinnelsen tilveiebringes en forsøksstrimmel til opptak av blodsukkerdagsprofiler, bestående av en bærer og en

164063

6

5 filmreaksjonsfolie hvor det er anbragt et glukoseoksydase-,
peroksydase- samt o-tolidinholdig enzym-indikator-gelatin-
sjikt, eventuelt med tilsats av myknere, fuktemidler, tverr-
bindingsmidler og/eller fargestoffkoblere og hvor glukose-
konsentrasjonen kan bedømmes ved et hvilket som helst tids-
punkt i løpet av 30 dager. Forsøksstrimmelen er kjennetegnet
ved at filmreaksjonsfolien som er forbundet med bæreren er
fremstilt ved etterbehandling med 0,01 til 0,1 molar
kompleksdannere i 5 til 30 sekunder, og eventuelt samtidig
10 med 0,01 til 1 molar acykliske hydroksyaminer hhv. aminoderi-
vater i 60 til 120 sekunder.

Den tørkede, besjiktede filmfolien blir i løpet av 5 til 30
sekunder, fortrinnsvis 5 til 10 sekunder, ført gjennom en
15 0,01 til 0,1 molar oppløsning av kompleksdanner,
fortrinnsvis nitriloeddiksyre eller etylendiamintetraeddik-
syre-dinatriumsalt, og deretter i 60 til 120 sekunder
gjennom en oppløsning av et acyklisk hydroksyamin eller et
aminoderivat ved en konsentrasjon på 0,01 til 1 molar,
20 fortrinnsvis 0,02 til 0,5 molar. Som cyklisk hydroksyamin
egner seg f.eks. kolin eller amino-trishydroksy-metyl-metan,
som aminoderivat kollidin, kinolin eller piperazin.

25 Det er imidlertid også mulig å behandle den besjiktede
filmfolien i en oppløsning istedet for 2 oppløsninger etter
hverandre. Et sjikt som er etterbehandlet på denne måten
oppfyller de krav som stilles til et opptaksmiddel for blod-
sukkerdagsprofilen, og kan anvendes ved alle vanlige
tilgjengelige refleksjonsmåleinnretninger.

30 Som filmfolie for påføring av reaksjonssjikt anvendes
vann-uopløselige kunststoffer, som kan være fargeløse eller
også fargede.

35 Besjiktningen av filmfolien kan finne sted over hele flaten,
eller bare over en del av av denne i en hvilken som helst

teknisk mulig bredde, alt etter anvendelsesformål eller økonomiske krav.

For vurdering av den besjiktete filmfolien på relfleksjonsfotometeret er det hensiktsmessig å anvende en hvit folie som bærer.

En universell løsning oppnås når man anvender en gjennomiktig, besjiktet filmfolie som delvis kan være forbundet med en hvit bærerkartong ved forsegling eller sammenklebing slik at både refleksjons- og også gjennomfallende lys-måling er mulig på den samme forsøksstrimmelen. Til sammenklebing kan man benytte klebebånd bestående av PVC-, polyester-, celluloseacetat- og andre folier som er besjiktet med et klebestoff. De fremstilte forsøksstrimlene kan inneholde områder for påføring av navn, dato og klokkeslett, og kan derved skrives på og vil ikke forveksles.

Slike besjiktete og etterbehandlede filmfolier kan også anvendes til kvantitativ glukosebestemmelse i urin og kan på tilsvarende måte, kun med endring av reaksjonstiden, bedømmes på tilgjengelige innretninger til blodsukkerbestemmelse. Dermed blir det mulig å bestemme den individuelle nyreterskelen til diabetikeren som en dagsprofil, hvor igjennom den daglige kontrollen med halvkvantitative forsøksstrimler kan presiseres individuelt.

Spesielt fordelaktig har det for dette formålet vist seg å være å anvende filmreaksjonsfolier ifølge oppfinnelsen forbundet med filterpapir ved klebing eller eventuelt ved forsegling på en slik måte at sjiktsiden kommer til ligge på filterpapiret.

Til klebing benyttes en fargeløs folie som ikke forstyrrer måleresultatene, f.eks. en polyester- eller celluloseacetatfolie som er besjiktet med et klebestoff. Den besjiktete filmfolien skjæres i 5 til 10 mm brede bånd og

164063

8

båndet festes i den ene enden, fortrinnsvis i begge endene til bærereren.

5 Ved neddykking av bærereren overfører filterpapiret den oppsugde væsken til reaksjonssjiktet og virker dermed samtidig som et doseringsmiddel, idet et overskudd av væsken som skal undersøkes føres videre langs strimmelen.

10 Forsøksstrimlene ifølge oppfinnelsen gir fargestabile, dokumentasjonsdyktige fargedannelser som tilsvarer det aktuelle glukoseinnhold, og kan ved et hvilket som helst tidspunkt bedømmes av diabetikeren selv, den behandlende legen, eller i et laboratorium.

15 Forsøksstrimlene ifølge oppfinnelsen er tilstrekkelige holdbare ved romtemperatur til at de tåler postforsendelsen fra lege til diabetiker og etter benyttelse fra diabetiker til lege uten at resultatene blir dårligere.

20 Forsøksstrimlene ifølge oppfinnelsen kan bedømmes ved hjelp av gjennomfallende lys og dessuten i en refleksjonsmåleinnretning. Fargedannelsen og ekstinksjonsøkningen kan innstilles slik at man ved hjelp av to justeringsstrimler kan bedømme to måleområder med den samme forsøksstrimmelen, 25 derved økes nøyaktigheten av resultatene.

30 Det er mulig, spesielt for mindreårige og gravide diabetikere å innstille et måleområde som hovedsaklig tilsvarer et forhøyet til svakt forhøyet glukosenivå, eller å strekke ut måleområdet med tyngdepunkt på normalt til for høyt glukosenivå.

35 Forsøksstrimlene løser dermed de krav som stilles til terapeutisk kontroll av alle diabetesformer og muliggjør en universell bedømmelse og anvendelse.

UtførelseseksemplerEksempel 1

En 7% gelatinoppløsning, som i 100 ml inneholder 2000 U-peroksydase og 8000 U-glukoseoksydase, 0,3 g o-tolidin samt 0,45 g av et naftolderivat som kobler og i tillegg fuktemidler og myknere, omsettes før besjiktning med et herdemiddel, f.eks. et krom-III-salt. Med denne oppløsningen påføres et 20 µm tykt sjikt på en filmfolie av polyester og tørkes. Ved neddykking gjennombløtes sjiktet 10 sekunder med en 0,01 molar oppløsning av etylendiamintetraeddiksyre-dinatriumsalt; overskytende væske fjernes og filmpreparatet føres straks igjennom et andre neddykkingsbad som inneholder 0,05 mol kollidin hvor skiktet gjennombløtes eller etterbehandles i ytterligere 90 sekunder. Deretter tørkes det gjennombløtte, etterbehandlede sjiktet på kjent måte.

Eksempel 2

Ved en annen utførelse ifølge eksempel 1 anvendes for etterbehandlingen i stedet for kollidin

- piperazin i en 0,03 molaroppløsning,
- kolin i en 0,04 molaroppløsning,
- amino-trishydroksymetyl-metan i en 0,02 molaroppløsning.

Eksempel 3

Ved en annen utførelse, analog eksempel 1, gjennomføres oppbløtningen og etterbehandlingen med en oppløsning. For dette formål løses 0,01 mol av etylendiamintetraeddiksyre-dinatriumsalt og 0,05 mol amino-trishydrokso-metyl-metan sammen i 1000 ml vann og filmreaksjonssjiktet gjennombløtes og etterbehandles i denne oppløsningen i 80 sekunder.

Eksempel 4

Ved en annen utførelse, ifølge eksempel 1, tilsettes etterbehandlingsoppløsningen 0,01% pinaverdol, hvorved reaksjonssjiktet farges svakt rødfiolett, uten at de senere målinger og måleresultater derved forstyrres.

164063

10

Eksempel 5

Frengangsmåten fra eksempel 1 følges. Den besjiktete filmfolien forsegles med reaksjonssjiktet opp og filmfolien mot bæreren på en hvit bærerkartong.

5

Eksempel 6

Frengangsmåten fra eksempel 1 følges. Den besjiktete filmfolien klebes med reaksjonssjiktet mot bæreren på et hvitt filterpapir ved hjelp av klebefolie i begge endene, hvorved klebefolien dekker den besjiktete filmfolien fullstendig mens dens på bæreren bare dekker 5 mm.

10

Eksempel 7

Frengangsmåten fra eksempel 1 følges. Som bærer anvendes en kunsttrykkartong som er bestrøket med gelatin. Det benyttes en filmreaksjonsfolie som er belagt med gelatin på baksiden. Forbindelsen mellom filmreaksjonsfolien og bærerkartongen foregår ved hjelp av et vandig klebemiddel som er påført i den ene enden.

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

Forsøksstrimmel til opptak av blodsukkerdagsprofiler, bestående av en bærer og en filmreaksjonsfolie hvor det er anbragt et glukoseoksydase-, peroksydase- samt o-tolidinholdig enzym-indikator-gelatin-sjikt, eventuelt med tilsats av myknere, fuktemidler, tverrbindingmidler og/eller fargestoffkoblere og hvor glukosekonsentrasjonen kan bedømmes ved et hvilket som helst tidspunkt i løpet av 30 dager, karakterisert ved at filmreaksjonsfolien som er forbundet med bæreren er fremstilt ved etterbehandling med 0,01 til 0,1 molar kompleksdannere i 5 til 30 sekunder og eventuelt samtidig med 0,01 til 1 molar acykliske hydroksyaminer hhv. aminoderivater i 60 til 120 sekunder.

2.

Forsøksstrimmel ifølge krav 1, karakterisert ved at den oppsvellede og med kompleksdannerne og de acykliske hydroksyaminene hhv. aminoderivatene etterbehandlede filmreaksjonsfolien er forbundet med en bærer.

3.

Forsøksstrimmel ifølge kravene 1 og 2, karakterisert ved at filmreaksjonsfolien er etterbehandlet med kompleksdannere i fortrinnsvis 5 til 10 sekunder.

4.

Forsøksstrimmel ifølge kravene 1 og 3, karakterisert ved at filmreaksjonsfolien er blitt etterbehandlet med nitrilotrieddiksyre.

5.

Forsøksstrimmel ifølge kravene 1 til 3, karakterisert ved at filmreaksjonsfolien er blitt etterbehandlet ved hjelp av etylen-diamintetraeddiksyre-dinatrium-salt.

164063

12

6.

Forsøksstrimmel ifølge kravene 1 og 2, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at filmreaksjonsfolien er blitt etter-
behandlet med 0,02 til 0,5 molar acykliske hydroksyaminer
5 hhv. aminoderivater.

7.

Forsøksstrimmel ifølge kravene 1, 2 og 6, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at filmreaksjonsfolien er blitt
10 etterbehandlet med av kolin.

8.

Forsøksstrimmel ifølge kravene 1, 2 og 6, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at filmreaksjonsfolien er blitt
15 etterbehandlet med av amino-trishydroksymetylmethan.

9.

Forsøksstrimmel ifølge kravene 1, 2 og 6, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at filmreaksjonsfolien er blitt
20 etterbehandlet med av kollidin, piperazin eller kinolin.

10.

Anvendelse av forsøksstrimmel ifølge kravene 1 til 9 for
glukosebestemmelse i urin for derigjennom å bestemme den
25 individuelle nyreterskelen hos diabetikere ut fra den påviste
dagsprofilen.

30

35