(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 915510 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 915510

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
G01N 33/52

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.11.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **22.11.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.05.1992**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

23.11.1990 US 617319

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Eastman Kodak Co,** 343 State Street, Rochester, NY 14650, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Hamann, John Eric,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Jacobs, Merrit Nyles,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •**Nealon, Daniel Anthony,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •**Appell, Charles Howard,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •**Detwiler, Richard Linn,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Analyyttisiä elementtejä, jotka sisältävät reagoimattomia estäviä väriaineita

Analytiska element som innehåller icke-reagerande blockerande färgämne

Analyyttisiä elementtejä, jotka sisältävät reagoimattomia estäviä väriaineita

Esillä oleva keksintö kuuluu kliinisen kemian alaan. Tarkemmin sanottuna se koskee analyyttisiä elementtejä analyyttien määrittämiseksi kvantitatiivisesti.

Analyyttisiä elementtejä, erityisesti monikerroksisia analyyttisiä elementtejä käytettäviksi erilaisten biologisesti mielenkiintoisten analyyttien kvantitatiivisessa määrityksessä tunnetaan US-patenttijulkaisuista 4 670 381, 4 517 288, 4 258 001, 4 066 403 ja 3 992 158. Elementeissä analyyttien, kuten hiilidioksidin, aspartaattiaminotransferaasin (ASAT), laktaattidehydrogenaasien (LD) ja alaniiniaminotransferaasin (ALAT) määrittämiseksi entsymaattisilla menetelmillä käytetään NADH:ta ja mitataan heijastustiheys aallonpituudella 340 nm mielenkiinnon kohteena olevan analyytin määrittämiseksi kvantitatiivisesti.

Kun kyseessä ovat analyytit, joihin juuri viitattiin, mittaus suoritetaan spektrofotometrisesti reflektometriä käyttäen. Reflektometrissä energiasäde, kuten valonsäde, heijastetaan peilistä ja sen jälkeen elementin kantaja-, reagenssi- ja rekisteröintikerrosten läpi. Sitten valo heijastetaan takaisin suodattimen läpi detektorivälineelle, kuten fotodiodille. Heijastustiheyden (DR) muutos vastaa analyytin pitoisuutta koeliuoksessa. Monissa käytössä olevissa reflektometreissä suurin saatavissa oleva DR on noin 1,5 aallonpituusalueella 320 - 360 nm. Ongelman muodostaa se, että joissakin päätepistemittausanalyyseissä, kuten mitattaessa CO_2:ta entsymaattisesti, muodostunut maksimi-DR on 2,0 aallonpituudella 340 nm. Niinpä on ilmeistä, että käytettäessä reflektometrejä, joiden suurin saatavissa oleva DR on 1,5, käytettävä dynaaminen alue kapenee merkittävästi ja siten tarkkuus huononee.

Esillä oleva keksintö antaa käyttöön analyyttisen elementin analyytin määrittämiseksi kvantitatiivisesti

mittaamalla heijastustiheys aallonpituusalueella 320 - 360 nm, jolloin elementti käsittää reagenssikerroksen ja rekisteröintikerroksen, ja elementille on tunnusomaista, että toinen näistä kerroksista sisältää väriainetta, joka absorboi heikosti aallonpituusalueella 320 - 360 nm ja tehokkaasti aallonpituusalueella 640 - 720 nm.

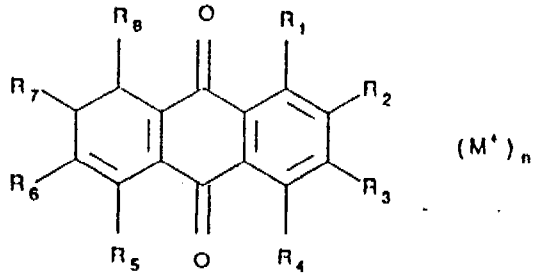
Väriaineen sisällyttäminen elementtiin lisää DR:n (heijastustiheyden) dynaamista aluetta, mikä johtaa tarkempiin analyytin kvantitatiivisiin mittauksiin aallonpituusalueella 320 - 340 nm. Lisäksi esillä olevalla keksinnöllä vältetään monet reflektometrien laitteesta laitteeseen -erot, jotka vaikuttavat energiaan aallonpituusalueella 640 - 720 nm, samoin kuin aallonpituusalueella 640 - 720 nm ilmenevät energiaerot, joita esiintyy aikaa myöten samassa laitteessa esim. valonlähteen vanhetessa. Esillä oleva keksintö lisää merkittävästi olemassa olevien reflektometrikonfiguraatioiden valmistuksen toimintavapautta. Suodatinkustannuksia voidaan alentaa, koska näiden suodattimien estäville ominaisuuksille voidaan asettaa vähemmän ankaria vaatimuksia.

Kuten edellä on mainittu, maksimiheijastustiheydet, joita voidaan mitata aallonpituudella 340 nm monissa nykyisissä reflektometreissä, on 1,5 DR. Näiden reflektometrien tarkka analysointi osoittaa, että niiden valonlähteet sisältävät runsaasti energiaa, jonka aallonpituus on 640 - 720 nm, ensimmäinen aallonpituusalueen 320 - 360 nm harmoninen alue. Tämä valonlähde on suhteellisen heikkoenerginen aallonpituusalueella 320 - 360 nm. Käytössä valonlähteen energia heijastetaan peilistä analyyttisen elementin eri kerroksiin. Itse elementti heijastaa energiaa, joka sisältää runsaasti aallonpituusaluetta 640 - 720 nm ja suhteellisen vähän aallonpituusaluetta 320 - 360 nm. Elementistä heijastunut energia kulkee interferenssisuodattimen läpi, joka suunnitellaan siten, että vain aallonpituudeltaan 320 - 360 nm oleva energia voi kulkea

läpi. Kuitenkin jonkin verran aallonpituudeltaan 640 - 720 nm olevaa energiaa kulkee suodattimen läpi. Sitten interferenssisuodattimen läpi kulkeva energia osuu fotodiodiin. Fotodiodin herkkyysprofiili osoittaa, että se on suhteellisen epäherkkä aallonpituudella 320 - 340 nm ja erittäin herkkä aallonpituudelle 640 - 720 nm. Tuloksena on se, että aallonpituudeltaan 640 - 720 nm oleva energia, jonka onnistuu kulkemaan interferenssisuodattimen läpi, yhdistyy läpi kylkevaan energiaan, jonka aallonpituus on 320 - 360 nm, ja osuu fotodiodiin aiheuttaen heijastustiheyden (DR) laskun. Siten monissa tapauksissa maksimi-DR, joka esiintyy esimerkiksi hiilidioksidin päätepistemäärityksessä, on noin 1,4. Tämä tarkoittaa, että päätepistekemiamittaukset aallonpituudella 340 nm tehdään usein reflektometreillä, joissa on kaventunut mittausalue 0,6 - 1,4 DR.

On pystytty identifioimaan luokka väriaineita, jotka, kun ne sisällytetään analyyttisen elementin kerrokseen, merkittävästi vähentävät aallonpituusalueella 640 - 720 nm olevaa energiaa, jota saattaa tulla interferenssisuodattimelle. Tuloksena on se, että merkittävästi vähemmän energiaa, jonka aallonpituus on 640 - 720 nm, osuu fotodiodille, mikä lisää maksimitiheyttä, jonka reflektometri voi mitata aallonpituusalueella 320 - 360 nm.

Väriaineluokalla, jota voidaan käyttää esillä olevassa keksinnössä, on rakenne

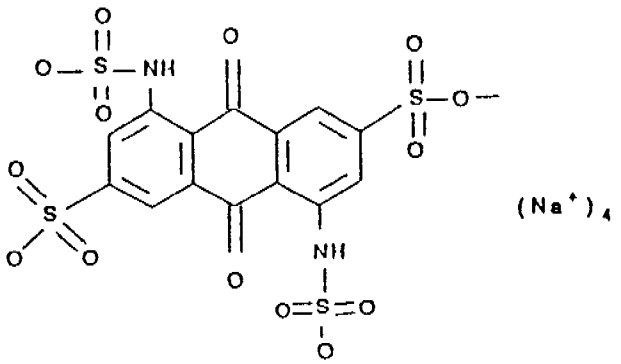


(I)

jossa R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 ja R^8 ovat kukin itsenäisesti vety, hydroksyyli, sulfometyyliamino, $-NH(SO_3)^-$ tai sulfo-

nihappo $-SO_3^-$, jolloin vähintään kaksi ryhmistä R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 ja R^8 ovat $-SO_3^-$; M^+ on Na^+ tai K^+ ja n on vähintään 2.

Tällaisia väriaineita sisällytetään asianmukaisiin elementteihin pitoisuutena 0,1 - 0,4 g/m^2, vaikka jotkut väriaineet, joilla on edellä oleva rakenne, voivat olla tehokkaita annetun pitoisuusalueen ulkopuolella. Pitoisuuden määrää väriaineen määrä, jolla saadaan riittävä DR aallonpituusalueen 640 - 720 nm läpi vaikuttamatta merkittävästi suurentuneeseen DR:ään aallonpituusalueen 320 - 360 nm läpi. Erityisen käyttökelpoisia väriaineita, joilla on edellä annettu rakenne, ovat sellaiset, joissa n on enintään 4. Käyttökelpoinen väriaine absorboi energiaa aallonpituudella 680 nm ja on suhteellisen läpinäkyvä aallonpituudella 340 nm. On edullista, että väriaineet ovat vesiliukoisia päällystämisen mukavuuden vuoksi, vaikka veteen liukenemattomia väriaineita voidaan käyttää. Erityisen käyttökelpoisen väriaineen rakenne on



(II)

Tämä väriaine kuvastaa käyttökelpoisten rakenteen I mukaisten väriaineiden ainutlaatuisuutta siinä suhteessa, että sillä on suhteellisen läpinäkyvä viiva aallonpituusalueella 310 - 480 nm ja merkittävä absorptioviiva aallonpituusalueella 550 - 750 nm.

Esillä olevan keksinnön käyttöön antama kuiva monikerroksinen koe-elementti käsittää yhden tai useampia reagenssivyöhykkeitä tai -kerroksia ja rekisteröintivyöhyk-

keitä tai -kerroksia. Kun tämän jälkeen puhutaan kerroksista, viitataan myös vyöhykkeisiin. Eräässä esillä olevan keksinnön sovellutusmuodossa elementti käsittää puskuroidun reagenssikerroksen (puskuroituja reagenssikerroksia) ja puskuroidun rekisteröintikerroksen (puskuroituja rekisteröintikerroksia). Elementin kerrokset voivat olla itseään tukevia, mutta ovat edullisesti kantajalla. Reagenssikerros on edullisesti läpäisevä ja huokoinen. Läpäisevyys, mukaan lukien läpäisevyys, joka syntyy huokoisuudesta, voidaan saavuttaa käyttämällä erilaisia kantajia, matriiseja tai sitojia, kuten kuitumaisia materiaaleja tai huokoisia, ei-kuitumaisia materiaaleja, joita on kuvattu edellä mainitussa US-patenttijulkaisussa 4 144 306. Edullinen keksinnön mukainen läpäisevä sitoja on edellä kuvattu luokka himmennettyjä polymeereja. Käyttökelpoinen huokoisena kantajana on myös polymeerisitoja, jossa on siihen dispergoituneena inerttiä, partikkelimuodossa olevaa materiaalia, kuten mikrokiteistä selluloosaa. Pigmenttipartikkeleita voidaan sisällyttää reagenssikerrokseen valoa heijastamaan. Rekisteröintikerroksia on kuvattu edellä mainitussa US-patenttijulkaisussa 4 144 306. Rekisteröintikerros on läpäisevä, jotta se ottaa vastaa diffundoituvaa materiaalia reagenssikerroksesta.

Edulliset esillä olevan keksinnön mukaiset elementit sisältävät leviämiskerroksen, välikerroksen, reagenssikerroksen, rekisteröintikerroksen tai yhdistetyn rekisteröinti/reagenssikerroksen. Näiden kerrosten koostumus ja niiden sijainti elementissä ovat alalla tunnettuja ja myös esitetty US-patenttijulkaisussa 3 992 158 ja edellä viitejulkaisuna mainitussa US-patenttijulkaisussa 4 144 306. Leviämiskerrokset voivat esimerkiksi olla isotrooppisesti huokoisia, jolloin ne saavuttavat tällaisen huokoisuuden käytettäessä inerttejä partikkelimateriaaleja ja/tai himmeitä polymeereja, ja ne voidaan sijoittaa reagenssikerroksen viereen, elementin uloimmaksi kerrokseksi (jos käy-

tetään monikerroselementtiä). Mikä tahansa esillä olevan keksinnön mukaisista kerroksista voi sisältää myös tunnettuja lisäaineita, kuten puskureita, pinta-aktiivisia aineita tai päällystyksen apuaineita, kuten edellä mainitussa US-patenttijulkaisussa 4 144 306 on kuvattu.

Keksinnön mukaiset monikerroselementit voidaan valmistaa erilaisilla alalla tunnetuilla laminointi- tai päällystysmenetelmillä, kuten päällystämällä käsin, päällystämällä terä, päällystämällä helmi tai upotuspäällystämällä. Nämä elementit voivat olla itseään tukevia tai ne voivat olla kantajalla. Käyttökelpoisia kantajamateriaaleja ovat lukuisat polymeerimateriaalit, kuten selluloosaasetaatti, poly(etyleenitereftalaatti), polykarbonaatit ja polyvinyyliyhdisteet, kuten polystyreenit. Kantaja on säteilyä siirtävä. Päällystys- ja laminointimenetelmiä ja kantajamateriaaleja kuvataan lisää edellä mainitussa US-patenttijulkaisussa 4 144 306.

Päällystettäville reagenssikerroksille päällystysliuos tai -dispersio, joka sisältää sitojan, ja joka on päällystetty tässä kuvatulla tavalla ja kuivattu ulottuvuuksiltaan pysyvän vyöhykkeen muodostamiseksi. Minkä tahansa reagenssikerroksen paksuus ja sen läpäisevyysaste vaihtelevat laajasti ja riippuvat varsinaisesta käytöstä. Kuivapaksuus 10 - 100 mm on tarkoituksenmukainen, vaikka paksuus, joka vaihtelee vielä laajemmalla alueella, on käyttökelpoinen. Kuitumaisia reagenssikerroksia voidaan muodostaa kyllästämällä kuitumainen matriisi hyvin tunnettujen menetelmien mukaisesti.

Rekisteröintikerrokset ja muut kerrokset voidaan valmistaa käyttäen menetelmiä ja paksuuksia, joita käytettiin valmistettaessa päällystettäviä reagenssikerroksia, mutta aineosilla, jotka sopivat tähän kerrokseen.

Esillä olevan keksinnön mukaisia elementtejä käytetään lisäämällä määritettävän kehon nesteen näytettä elementille. Yleensä elementti muodostetaan siten, että neste

pääsee kosketukseen ensin yhden tai useamman leviämiskerroksen tai -vyöhykken kanssa. Kun neste on lisätty, elementti voidaan saattaa mihin tahansa olosuhteisiin, kuten kuumennus tai kostutus, jotka ovat haluttuja testituloksen saannin nopeuttamiseksi tai muuten helpottamiseksi.

Kun on kulunut sopiva aika, joka sallii näytteen diffundoitumisen leviämiskerroksesta reagenssikerrokseen ja rekisteröintikerrokseen, todettavissa olevan aineen määrä rekisteröintivyöhykkeessä määritetään spektrofotometrisesti reflektometrillä.

Esimerkki

Sen osoittamiseksi, että rakenteen I mukaisen väriaineen sisällyttäminen analyyttiseen elementtiin on tehokasta reflektometristen mittausten suorittamiseksi aallonpituusalueella 320 - 360 nm, väriaine sulfometyylisininen, jolla on rakenne II, sisällytettiin seuraavan, CO_2:n määritykseen tarkoitetun elementin reagenssikerrokseen.

Analyyttinen elementti CO_2:lle

		Kuiva määrä Pitoisuus (/m^2)	Alue (/m^2)
Leviämiskerros	Bariumsulfaatti	108,592 g	50 - 250 g
	Selluloosa-asetaatti	8,629 g	2,0 - 10,0 g
	Triton X-405 -pinta-aktiivinen aine	2,159 g	0,5 - 5,0 g
	Tris(hydroksimetyyli)-aminometaani (THAM)	1,385 g	0,0 - 5,0 g
	Tris-hydrokloridi (Tris-HCl)	1,203 g	0,0 - 5,0 g
	Estane-hartsi	1,082 g	1,0 - 5,0 g
Välikerros	N-vinyylipyrrolidoni (PVP)	1,070 g	0,3 - 5,0 g
Reagenssikerros	Gelatiini	10,0 g	1,0 - 20,0 g
	Alkanol XC -pinta-aktiivinen aine	0,1 g	0,05 - 2,5 g
	Zonyl FSN -pinta-aktiivinen aine	0,02 g	0,01 - 2,5 g
	$MgSO_4$	0,50 g	0,1 - 5,0 g
	Trisiini	3,401 g	0,5 - 5,0 g
	Fosfoenolipyruvaatti	3,25 g	2,5 - 10,0 g
	Fosfoenolipyruvaatti-karboksylaasi	1 524 U	1 000 - 20 000 U
Rekisteröinti-kerros	Gelatiini	7,14 g	1,0 - 20,0 g
	Alkanol XC -pinta-aktiivinen aine	0,1 g	0,05 - 2,5 g
	Zonyl FSN -pinta-aktiivinen aine	0,020 g	0,01 - 2,5 g
	Bis(vinyylisulfonyyli metyyli)eetteri (BVSME)	0,173 g	0 - 2,5 g
	Trisiini	3,401 g	0,5 - 5,0 g
	NADH	3,0 g	2,0 - 5,0 g
	MDH	1076 U	1 000 - 30 000 U

Vaikka väriaine sisällytettiin reagenssikerrokseen, se olisi voitu yhtä hyvin sisällyttää rekisteröintikerrokseen.

Koenäytteiden CO_2-arvot määritettiin edellä olevaa CO_2-elementtiä käyttäen EKTACHEM Clinical Chemistry Analyzer -analysaattorilla (saatavissa Eastman Kodak Company -yhtiöstä, Rochester, New York). Myös elementti on saatavissa Eastman Kodak -yhtiöstä.

Heijastustiheyden (DR) mittaukset tehtiin käyttäen edellä olevaa elementtiä, jossa ei ollut väriainetta (kuvio 1) ja ja elementtiä, jossa oli väriainetta (kuvio 2). Lukemat mitattiin koenäytteille, jotka sisälsivät 0 mmol CO_2:a (A), 14,9 mmol CO_2:a (B) ja 32,9 mmol CO_2:a (C), ja vedelle, joka ei sisältänyt CO_2:a (D). Sekä kuviossa 1 että kuviossa 2 esitetään reflektiotiheys ajan funktiona. Näiden kuvioiden vertailusta käy ilmi, että värin lisääminen elementtiin lisää DR-arvoa aallonpituudella 340 nm kaikilla käyrillä (A), (B), (C) ja (D).

Kuvio 3 esittää DR:ää pitoisuuden funktiona. Kuviossa 3 on kaksi käyrää koenäytteiden (A), (B), (C) ja (D) DR:lle mitattuna elementillä, jossa on väriainetta (o) ja jossa ei ole väriainetta (W). Mittaukset tehtiin aallonpituudella 340 nm. Kahden käyrän vertailu osoittaa, että DR laskee arvosta noin 1,4 arvoon noin 0,9, kun CO_2-pitoisuus kasvaa käytettäessä elementtiä, jossa ei ole väriainetta. Tämä on DR:n muutos 0,5. Käytettäessä elementtejä, joissa on väriainetta, DR vähenee arvosta noin 1,7 arvoon noin 1,0 yksikköä, kun CO_2-pitoisuus kasvaa. Tämä on DR:n muutos 0,7. Tämä edustaa 40 prosentin kasvua dynaamisessa alueessa, millä saadaan lisääntynyt herkkyys aallonpituudella 340 nm.

Edellä olevat tulokset todistavat, että rakenteen I mukaisen värin sisällyttäminen kuivaan analyyttiseen elementtiin lisää dynaamista heijastustiheysaluetta, jolla analyyttien mittaukset voidaan tehdä aallonpituudella

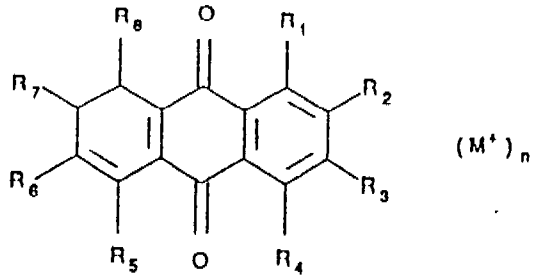
320 - 360 nm. Värin sisällyttämisellä vältetään myös erot reflektometristä reflektometriin ja samassa reflektometrissä aikaa myöten esiintyvät erot.

Vaikka esillä olevaa keksintöä on kuvattu käyttäen analyyttistä elementtiä, joka on suunniteltu hiilidioksidin mittaukseen aallonpituudella 340 nm, alan ammattimiehet ymmärtävät, että mitä tahansa analyyttimittauksia aallonpituusalueella 320 - 360 nm voidaan tehostaa esillä olevaa keksintöä käyttäen.

Patenttivaatimukset:

1. Analyyttinen elementti analyytin määrittämiseksi kvantitatiivisesti mittaamalla reflektiotiheys aallonpituusalueella 320 - 360 nm, jolloin elementti käsittää reagenssikerroksen ja rekisteröintikerroksen, t u n n e t t u siitä, että toinen näistä kerroksista sisältää väriainetta, joka absorboi heikosti aallonpituusalueella 320 - 360 nm ja absorboi tehokkaasti aallonpituusalueella 640 - 720 nm.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elementti, t u n n e t t u siitä, että väriaineella on rakenne

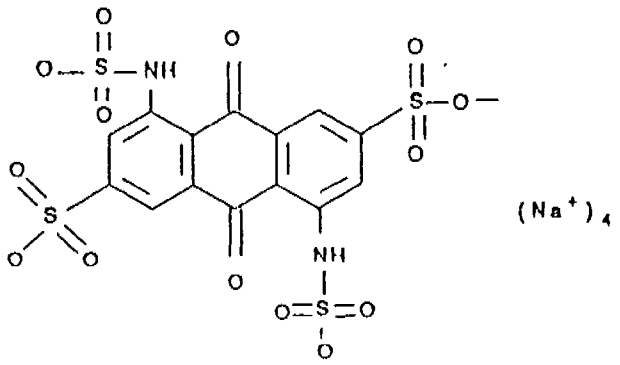


(I)

jossa R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 ja R^8 ovat kukin itsenäisesti vety, hydroksyyli, sulfometyyliamino, $-NH(SO_3)^-$ tai sulfonihappo $-SO_3^-$, jolloin vähintään kaksi ryhmistä R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 ja R^8 ovat $-SO_3^-$; M^+ on Na^+ tai K^+ ja n on vähintään 2.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen elementti, t u n n e t t u siitä, että n on enintään 4.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen elementti, t u n n e t t u siitä, että väriaine on sulfometyylisininen, jolla on rakenne



(II)

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen elementti, t u n n e t t u siitä, että analyytti on hiilidioksidi, aspartaattiaminotransferaasi, alaniiniaminotransferaasi tai laktaattidehydrogenaasi.

6. Patenttivaatimuksen 1, 3 tai 5 mukainen elementti, t u n n e t t u siitä, että väriainetta on läsnä elementissä pitoisuutena 0,1 - 0,4 g/m^2.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen elementti, t u n n e t t u siitä, että väriaine on vesiliukoinen.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen elementti, t u n n e t t u siitä, että analyytin pitoisuus mitataan aallonpituusalueella 320 - 360 nm.

FIG. 1

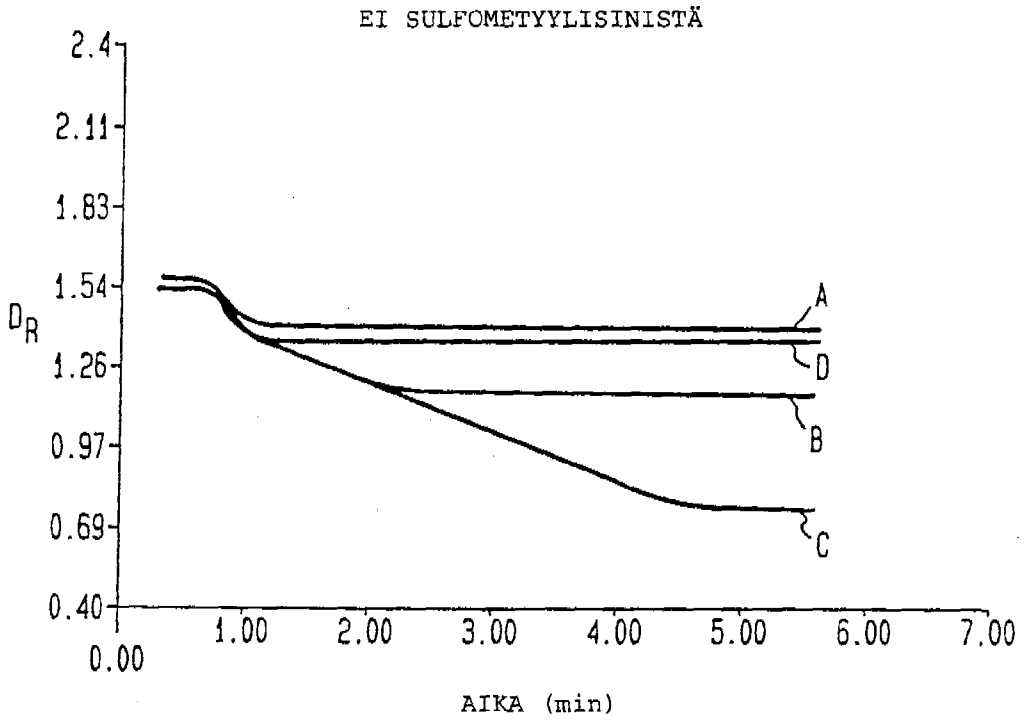
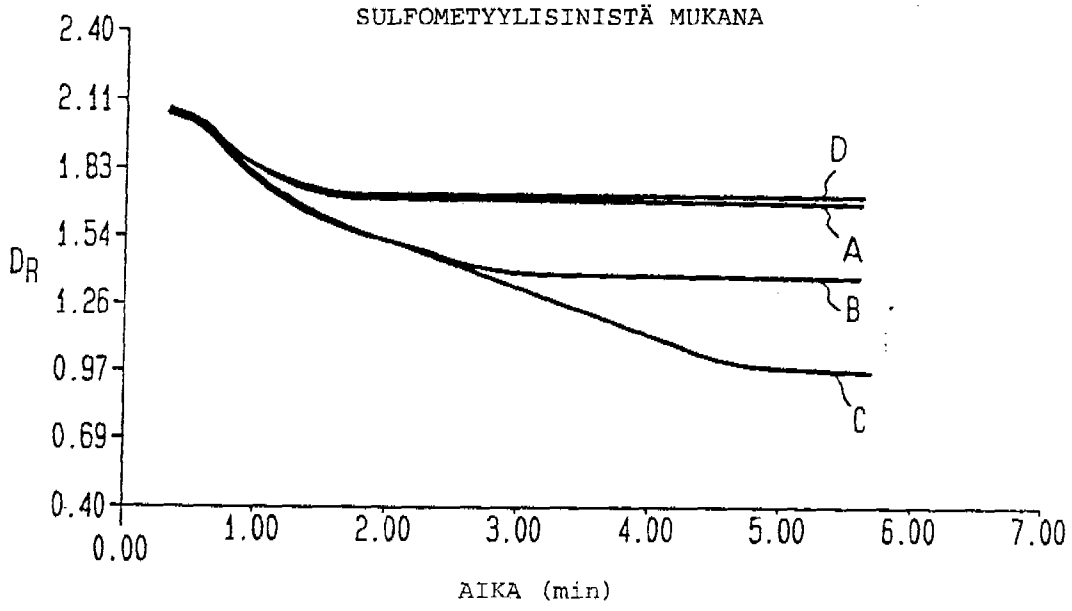

EI SULFOMETYYLISINISTÄ
2.4
2.11
1.83
1.54
1.26
0.97
0.69
0.40
D_R
A
D
B
C
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
AIKA (min)

FIG. 2


SULFOMETYYLISINISTÄ MUKANA
2.40
2.11
1.83
1.54
1.26
0.97
0.69
0.40
D_R
D
A
B
C
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
AIKA (min)

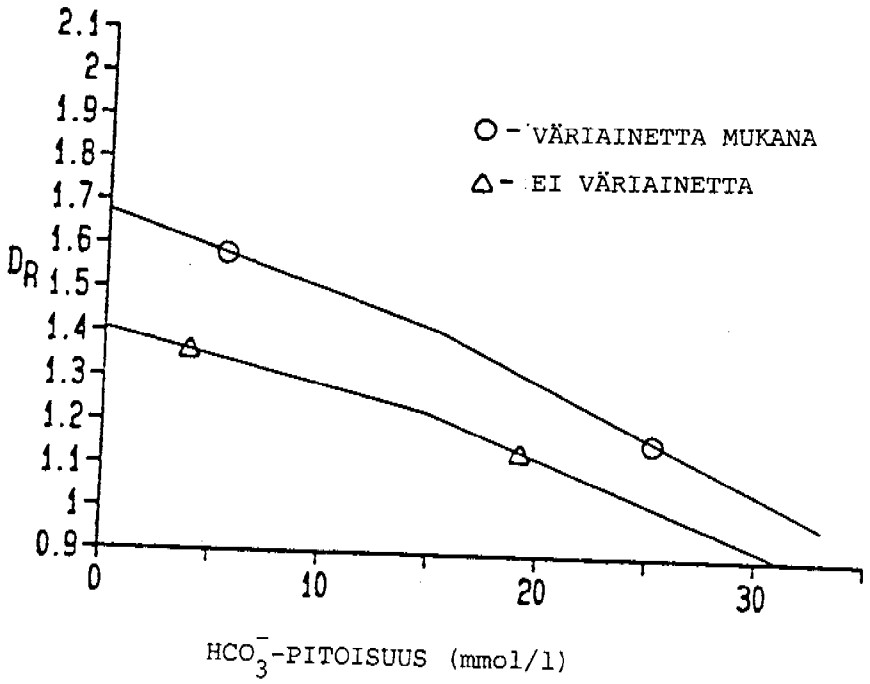

2.1
2
1.9
1.8
1.7
1.6
D_R 1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1
0.9
0
10
20
30
○ - VÄRIAINETTA MUKANA
△ - EI VÄRIAINETTA
HCO_3^--PITOISUUS (mmol/l)

FIG. 3