



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: G 01 N 33/50

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

640 059

⑳① Gesuchsnummer:	3235/77	⑦③ Inhaber:	Miles Laboratories, Inc., Elkhart/IN (US)
⑳② Anmeldungsdatum:	15.03.1977		
⑳③ Priorität(en):	18.03.1976 US 667981 17.09.1976 US 724365	⑦② Erfinder:	Katharine Gentry Johnston, Elkhart/IN (US) Jerome Greyson, Elkhart/IN (US)
⑳④ Patent erteilt:	15.12.1983		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.12.1983	⑦④ Vertreter:	E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Testvorrichtung zum Auffinden einer Komponente in einer Probe.**

⑤⑦ Die erfindungsgemässe Testvorrichtung zum Auffinden einer Komponente in einer Probe ist gekennzeichnet durch eine Träger-Matrix, der

- a) ein Reagens-System, das nach Kontakt mit der Probe mit der genannten Komponente reagiert, unter Erzeugung einer erkennbaren Reaktion, und
- b) ein Inhibitor-System, das nach Kontakt mit der Probe die Wechselwirkung zwischen dem Reagens-System und der Komponente nach Ablauf einer vorbestimmten Zeit verhindert, einverleibt ist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Testvorrichtung zum Auffinden einer Komponente in einer Probe, gekennzeichnet durch eine Träger-Matrix, der
a) ein Reagens-System, das nach Kontakt mit der Probe mit der genannten Komponente reagiert, unter Erzeugung einer erkennbaren Reaktion, und

b) ein Inhibitor-System, das nach Kontakt mit der Probe die Wechselwirkung zwischen dem Reagens-System und der Komponente nach Ablauf einer vorbestimmten Zeit verhindert, einverleibt ist.

2. Testvorrichtung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch ein Inhibitor-System, das nach Kontakt mit der Probe zur Wärmentswicklung befähigt ist, so dass die Temperatur der Vorrichtung nach einer vorbestimmten Zeit derart erhöht wird, dass das Reagens-System von weiterer Wechselwirkung mit der Komponente abgehalten wird.

3. Testvorrichtung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch ein Inhibitor-System, das zur Vergiftung des Reagens-Systems nach einer vorbestimmten Zeit befähigt ist, so dass die Wechselwirkung zwischen Reagens-System und der genannten Komponente verhindert wird.

4. Testvorrichtung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch ein Inhibitor-System aus einem Material, das nach Kontakt mit der Probe härtet oder geliert.

5. Testvorrichtung nach Anspruch 1, zur Bestimmung von Glucose, Ketonen, okkultem Blut, Bilirubin, Urobilinogen, Cholesterin, Wasserstoffionen, Protein oder Nitrit.

6. Testvorrichtung nach Anspruch 1, bei welcher die erkennbare Reaktion eine Farbänderung ist.

7. Testvorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Geschwindigkeit der Erzeugung der erkennbaren Reaktion von der Menge der genannten Komponente in der Probe abhängt.

8. Testvorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Material mit solcher Geschwindigkeit geliert oder härtet, die ausreicht, um die Erzeugung der erkennbaren Reaktion nach einer vorbestimmten Zeit zu inhibieren.

9. Testvorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie im Inhibitor-System 2-Cyanacrylsäure oder einen Ester davon enthält.

10. Testvorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie im Inhibitor-System Polyvinylalkohol enthält.

11. Testvorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Gelierung oder Härtung durch Kontakt mit Wasser eingeleitet wird.

12. Verfahren zum Auffinden einer Komponente in einer Probe unter Verwendung der Testvorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) die Probe mit der Testvorrichtung in Berührung bringt,
- b) die Testvorrichtung nach Kontakt mit der Probe während einer vorbestimmten Zeit inkubiert, und
- c) die erkennbare Reaktion beobachtet.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Inhibitor-System aus einem Material besteht, das nach Kontakt mit der Probe härtet oder geliert.

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Inhibitor-System nach Kontakt mit der Probe Wärme erzeugt, so dass die Temperatur der Testvorrichtung nach einer vorbestimmten Zeit erhöht wird derart, dass die Wechselwirkung zwischen Reagens-System und Komponente verhindert wird.

15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Inhibitor-System zur Vergiftung des Reagens-Systems nach einer vorbestimmten Zeit befähigt ist.

16. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die zu bestimmende Komponente aus Glucose, einem

Keton, okkultem Blut, Bilirubin, Urobilinogen, Cholesterin, Wasserstoffionen, Protein oder Nitrit besteht.

17. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Inhibitor-System 2-Cyanacrylsäure oder einen Ester davon enthält.

18. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Inhibitor-System Polyvinylalkohol enthält.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Testvorrichtung zum Auffinden einer Komponente einer Testprobe, wobei ein System aus Reagenzien, die in der Testvorrichtung enthalten sind, nach Kontakt mit der Komponente eine nachweisbare Reaktion erzeugt, und wobei diese Erzeugung der nachweisbaren Reaktion nach Ablauf eines vorbestimmten Zeitraums aufhört.

Diagnostische Physik und Chemie haben sich im Verlauf der vergangenen 25 Jahre in ausserordentlicher Geschwindigkeit entwickelt, so dass, insbesondere im medizinischen Bereich, die Diagnose von Parametern eines Systems mit unglaublicher Leichtigkeit und Geschwindigkeit erfolgen kann.

Eines dieser sich stürmisch entwickelnden Gebiete ist das der medizinischen Diagnostika, durch die zahlreiche Körperfunktionen untersucht werden können, indem man einfach einen mit Reagens beladenen Streifen in eine Probe einer Körperflüssigkeit wie Urin eintaucht und eine nachweisbare Reaktion beobachtet, zum Beispiel das Auftreten einer Färbung oder einer Farbänderung oder einer Veränderung der Menge an vom Streifen reflektiertem oder absorbiertem Licht.

Im Verein mit diesen «Eintauch- und Ablese»-Methoden entwickelte sich eine vielfältige Chemie zur Auffindung von in Körperflüssigkeiten vorhandenen Komponenten. In den meisten Fällen entsteht eine nachweisbare Reaktion, die quantitativ oder mindestens halb-quantitativ ist. Indem man also die Reaktion nach einer vorbestimmten Zeit misst, erhält man nicht nur einen positiven Hinweis auf die Anwesenheit eines bestimmten Bestandteils einer Körperflüssigkeit, sondern auch einen Schätzwert über dessen Menge. Derartige Streifen bieten daher dem Mediziner ein einfaches diagnostisches Gerät und die Möglichkeit, das Ausmass einer Krankheit oder körperlichen Fehlfunktion zu beurteilen.

Beispiele für derartige Teststreifen, die heute verwendet werden, sind die Produkte der Ames Company Division der Miles Laboratories, Inc., die zum Beispiel unter den Handelsbezeichnungen Clinistix, Multistix, Ketostix, N-Multistix, Diastix, Phenistix, Dextrostix erhältlich sind. Derartige Testvorrichtungen bestehen gewöhnlich aus ein oder mehreren Träger-Matrizes, beispielsweise absorptionsfähigem Papier, das mit einem bestimmten System von Reagenzien imprägniert ist, welches in Gegenwart der betreffenden Komponente der Testprobe eine Farbänderung oder das Auftreten einer Färbung ergibt. Je nach den der Matrix einverleibten Reagenzien können derartige Vorrichtungen das Vorhandensein von Glucose, Albumin, Ketonen, Bilirubin, okkultem Blut, Nitrit, Urobilinogen, die Wasserstoffionenkonzentration (pH) oder dergleichen aufspüren. Das Auftreten einer spezifischen Färbung und deren nach einem festgelegten Zeitraum nach in Berührungbringen des Streifens mit der Probe zu beobachtende Intensität sind ein Hinweis auf die Anwesenheit der betreffenden Komponente und ihre Konzentration in der Probe. Einige derartige Testvorrichtungen und die darin enthaltenen Reagenzien sind in den US-PS 3 123 443 (Clinistix); 3 212 855 (Ketostix), 3 814 668, 3 164 534 und 2 981 606 (Diastix) und 3 092 465, 3 298 789, 3 164 534 und 2 981 606 (Dextrostix) beschrieben.

Typischerweise sind diagnostische Testvorrichtungen wie die «Eintauch- und Ableser»-Streifen von einer detaillierten Vorschrift begleitet, die genau befolgt werden muss, um ein genaues Ergebnis zu erzielen. Besteht die nachweisbare Reaktion aus einer Farbänderung, so muss besondere Sorgfalt angelegt werden. Hier wird eine Karte mit den verschiedenen Vergleichsfarben mitgeliefert, und, da in den meisten Fällen die quantitative Genauigkeit der Vorrichtung davon abhängt, dass man das Ausmass der Färbung in Bezug auf einen Zeitraum ermittelt, ist es unabdinglich, die Farbänderung mit der Karte nach einer vorgeschriebenen Zeit nach Eintauchen der Probe zu vergleichen. Die Wartezeiten müssen genau eingehalten werden, denn ein zu frühes Ablesen ergibt eine zu geringe Farbbildung, während bei zu spätem Ablesen eine zu intensive Färbung entsteht oder eine störende Zusatzfarbe. Wird also die entwickelte Färbung zu früh oder zu spät mit der Farbkarte verglichen, so kann und wird tatsächlich häufig ein falsches Ergebnis erhalten.

Beim Versuch, den kritischen Faktor des genauen Zeitpunktes der Ablesung zu eliminieren, der sowohl unbequem ist als auch möglicherweise falsche Ergebnisse in sich birgt, wurden intensive Forschungen dahingehend betrieben, die Notwendigkeit der Ablesung zu einem bestimmten Zeitpunkt bei den bekannten Testvorrichtungen auszuschliessen. Zunächst wurde ein Weg gesucht, wonach die Erzeugung einer nachweisbaren Reaktion automatisch nach einer vorbestimmten Zeit beendet sein sollte, und diese Reaktion dann während relativ langer Lagerzeiten konstant bleiben sollte. Der Vergleich mit der Farbkarte könnte dann zu einem dem Verwender bequemen Zeitpunkt erfolgen, oder lange nach dem eigentlichen Kontakt der Vorrichtung mit der Probe. Es bestand Einigkeit darüber, dass durch derartige Testvorrichtungen der Stand der Technik sprunghaft verbessert würde. Bis heute gibt es jedoch keinen Vorschlag, der die lang erwartete Lösung dieses Problems erkennen lässt. Die vorliegende Erfindung hingegen bietet eine solche Lösung.

Die Erfindung betrifft eine Testvorrichtung zum Auffinden einer Komponente in einer Probe und ein Verfahren zum Auffinden einer Komponente in einer Probe unter Verwendung dieser Testvorrichtung. Die Testvorrichtung umfasst ein Reagens-System, das nach Kontakt mit der betreffenden Komponente reagiert und eine erkennbare Reaktion erzeugt, sowie ein Inhibitor-System, das nach Ablauf eines vorbestimmten Zeitraums die weitere Reaktion des Reagens-Systems mit der Komponente verhindert. Die Testvorrichtung besteht aus einer Träger-Matrix, der das Reagenz- und Inhibitor-System einverleibt sind. Das Verfahren zum Auffinden einer Komponente in einer Probe besteht darin, dass man eine Testprobe, in der man die betreffende Komponente vermutet, mit der Testvorrichtung in Berührung bringt, die Testvorrichtung nach Kontakt mit der Probe während eines vorbestimmten Zeitraums inkubiert und die erkennbare Reaktion beobachtet.

In den Rahmen der Erfindung fallen zahlreiche Formen der diagnostischen Chemie, einschliesslich bekannter Reagens-Systeme, die heute in Verwendung sind, wie zum Beispiel pH- und andere Ionenkonzentrationsindikatoren, ferner komplexere Reagens-Systeme, wie sie zur Bestimmung von Komponenten von Körperflüssigkeiten verwendet werden. Diese sind für die erfindungsgemässe Anwendung ideal geeignet. Somit können sämtliche bisher bekannten diagnostischen Testvorrichtungen zum Beispiel auf okkultes Blut, Glucose, Bilirubin, Harnstoff-Stickstoff in Blut, Bakteriurea, Urobilinogen, Cholesterin, Proteine und andere entsprechend der Lehre der Erfindung modifiziert werden.

Die vorliegende Erfindung beruht darauf, dass man bekannte oder neue Reagens-Systeme so anwendet, dass die Wechselwirkung zwischen der aufzufindenden Komponente

in der Probe und dem Reagens-System nach einem vorbestimmten Zeitraum aufhört. Somit ist das Quantum der erkennbaren Reaktion für jedes gegebene Reagens-System fixiert: die bei der Reaktion entstehende Färbung wird weder verstärkt noch abgeschwächt; die Menge an gebildetem oder bei der Reaktion verbrauchtem, auf ultraviolettes Licht empfindlichem Produkt bleibt konstant.

Die beschriebenen Effekte können auf zahlreichen Wegen erzielt werden. Bevorzugt ist die Bereitstellung eines Inhibitor-Systems, das auf physikalische Weise die weitere Wechselwirkung verhindert durch Bildung eines Gels, eines Polymers oder einer gehärteten Oberfläche, wodurch der physikalische Kontakt zwischen Reagens-System und der Komponente nach Ablauf des vorbestimmten Zeitraums ausgeschlossen wird.

Eine weitere Möglichkeit ist die Bereitstellung einer Testvorrichtung mit einem Inhibitor-System, welches das Reagens-System deaktiviert. Ist beispielsweise ein wärmelabiles Enzym für das Funktionieren des Reagens-Systems kritisch, so kann das Inhibitor-System aus einem Wärme entwickelnden Mittel bestehen, welches die Temperatur der Testvorrichtung nach Ablauf des vorbestimmten Zeitraums auf einen Wert steigert, bei welchem das Enzym deaktiviert wird.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Bereitstellung eines Inhibitor-Systems, welches ein oder mehrere Komponente des Reagens-Systems vergiftet oder chemisch angreift, so dass die Wechselwirkung zwischen der Komponente der Probe nach dem vorbestimmten Zeitraum unterdrückt wird. Derartige und andere Inhibitor-Systeme liegen im Rahmen vorliegender Erfindung, wobei der entscheidende Faktor die Fähigkeit des Inhibitor-Systems ist, die Wechselwirkung zwischen Reagens-System und der zu testenden Komponente während des Kontakts zwischen Probe und Testvorrichtung zu erlauben, hingegen zu einem späteren, vorbestimmten Zeitpunkt diese Wechselwirkung auszuschliessen.

Wünscht man ein Inhibitor-System, das die Wechselwirkung zwischen Reagens-System und zu testender Komponente physikalisch verhindert, d.h. ein Inhibitor-System, das härtet oder geliert, so stehen zahlreiche Wege zur Verfügung. Zu den geeigneten gelierenden oder härtenden Materialien gehören solche, die bei Raumtemperatur schnell reagieren und nach Kontakt mit der Testprobe zu reagieren beginnen oder initiiert werden. Diese Inhibitor-Gemische müssen mit ausreichender Geschwindigkeit härten oder gelieren, so dass die Erzeugung der erkennbaren Reaktion nach relativ kurzem Zeitablauf inhibiert wird. Erwünscht ist gleichermassen, dass der gelierte oder gehärtete Inhibitor weitere Farbänderung oder eine weitere Verbreitung der nachweisbaren Reaktion hintanhält oder verhindert.

Typische Inhibitor-Systeme dieser Art sind polymerisierbare oder vernetzbare wasserlösliche Polymere, Epoxid/Polyamin-Gemische, mit Wasser reaktionsfähige Polyisocyanate, mit Hydroxylionen polymerisierbare Acrylat- und substituierte Acrylatester, Polyvinylalkoholgemische mit verschiedenen Metallverbindungen [zum Beispiel Borate, Vanadate, Cr(III) und Ti(IV)], Natriumcarboxymethylcellulose und Al(III), Polyvinylalkohole im Gemisch mit Polyphenolen (zum Beispiel Resorcin, Brenzkatechin, Phloroglucin, und Farbstoffen und Diazoniumsalzen), ein Gemisch aus Polyvinylalkohol und Dimethylolharnstoff mit Ammoniumchlorid-Katalysator, Dimethylolharnstoff-Gemische mit Hydroxylalkylcellulosen und hydrolysierten Maleinsäureanhydrid-Copolymeren oder Polyacrylsäure, Polyvinylalkohol-polyaldehyd-Gemische, Polyvinylpyrrolidon-Komplexe (d.h. mit Substanzen wie Polycarbonsäuren, einem Methylvinyläther-maleinsäureanhydrid-Copolymer der GAF-Corporation, oder einer Polyacrylsäure), Copolymere aus Säure/Polyäthylenglycolgemischen und Polyvinylalkoholgemische mit Fällmitteln

(zum Beispiel Na_2CO_3 , Na_2SO_4 oder K_2SO_4).

Eine Verzögerung der Polymerisation oder Vernetzung des wasserlöslichen Polymeren kann erreicht werden, indem man die Initiatoren vom wasserlöslichen Polymer isoliert hält, bis die Testvorrichtung mit der Testprobe in Berührung gekommen ist. Eine Möglichkeit einer derartigen Absonderung von Polymer und Initiator besteht in der Einkapselung des Initiators in wasserlösliche Mikrokapseln oder in Mikrokapseln, die bei Benetzung zerbrechen. So lösen sich den Initiator enthaltende Mikrokapseln aus Gelatine bei Berührung mit einer wässrigen Testprobe, wobei der Initiator zur weiteren Polymerisation des wasserlöslichen Polymeren freigesetzt wird.

Beim Benetzen zerbrechende Mikrokapseln besitzen osmotisch fragile, semipermeable Membranwände, die eine den Initiator enthaltende wässrige Phase einkapseln. Die wässrige Phase besitzt ein relativ hohes spezifisches Gewicht, verglichen mit der Testprobe. Werden die Kapseln mit der Testprobe in Berührung gebracht, so entsteht ein osmotischer Gradient über die Membran, der zu einer Druckzunahme in der Kapsel führt, die zum Aufbrechen der Wände ausreicht, so dass der Initiator freigesetzt wird.

Eine physikalische Inhibierung durch Abtrennung des Reagens-Systems von der zu testenden Komponente wird auch erreicht mit einem Inhibitor-System, das ein Epoxid und eine Quelle für deaktiviertes Polyamin umfasst, woraus beim Kontakt mit Wasser verfügbare Polyamine entstehen. Typische Polyaminquellen dieser Art sind Ketimine und mit einem Polyamin imprägnierte Molekularsiebe. Im ersteren Fall reagiert das Ketimin mit Wasser unter Bildung von Polyamin und Keton, im letzteren Fall dringt das Wasser in das Gitter des Molekularsiebs ein und verdrängt das Polyamin.

Die Testvorrichtung kann auch ein mit Wasser aufschäumbares Polyisocyanat wie zum Beispiel «Hypol» (Herst. Dewey and Almy Chemical Division W.R. Grace & Co.) enthalten.

Unter den durch Basen oder Hydroxylionen katalysierten Acrylat-Inhibitorsystemen sind die 2-Cyanacrylatester für die Zwecke der Erfindung besonders geeignet. Diese Ester sind essentielle Bestandteile von Klebstoffen der Eastman Kodak Company, sie polymerisieren in Gegenwart von Wasser schnell unter Bildung harter Polymerer. In handelsüblichen Klebstoffen, zum Beispiel der Firma Kodak, liegen in erster Linie die Methyl- und Äthylester vor, wobei diese Klebstoffe, neben den Estern, noch Stabilisatoren und Verdickungsmittel enthalten. Das Handelsprodukt Eastman 910 enthält 2-Cyanacrylsäuremethylester, und der hauptsächliche Ester im Produkt Eastman 910 EM ist der 2-Cyanacrylsäureäthylester.

Polyvinylalkohol geliert im Gemisch mit Borsäure rasch in Gegenwart von Alkali wie zum Beispiel Natriumhydroxid und eignet sich daher als Inhibitor-System. Eine bevorzugte Methode zur Anwendung dieser Alternative besteht darin, dass man das Alkali der Testvorrichtung in wasserlöslichen oder osmotisch fragilen Mikrokapseln beigt. Bei Kontakt mit der Testprobe werden auf diese Weise sämtliche Reagenzien des Inhibitor-Systems vereinigt, und die Bildung eines Gels beendet die Analyse.

Ausser der Brauchbarkeit mit Borax (Borsäure und Alkali) geliert Polyvinylalkohol auch mit verschiedenen anderen Metallionen und Salzen, zum Beispiel Vanadaten, dreiwertigem Chrom und vierwertigem Titan. Beispielsweise machen Kaliumtitanoxalat $\text{TiO}(\text{C}_2\text{O}_4\text{K})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und organische Titanate Polyvinylalkohol bei Raumtemperatur und einem pH-Wert oberhalb etwa 7 rasch unlöslich. Ausserdem bildet Polyvinylalkohol thermisch reversible Gele mit Polyphenolen wie Resorcin, Brenzkatechin, Phloroglucin und bestimmten Farbstoffe und Diazoniumsalzen.

Polyvinylalkohol ist ausserdem für die Zwecke der Erfin-

dung brauchbar aufgrund seiner Fähigkeit zur Vernetzung über eine Acetalbildung mit 1,3-Bis-hydroxymethylharnstoff (Dimethylolharnstoff) und ähnliche Verbindungen in Gegenwart von Ammoniumchlorid. Wie in dem vorangehend beschriebenen System kann der Katalysator oder Initiator (Ammoniumchlorid) zum Beispiel durch Einschluss in Mikrokapseln abgesondert werden.

Auch polyfunktionelle Aldehyde reagieren mit Polyvinylalkohol unter Acetal-Vernetzung. In diesem Fall wird ein saurer Katalysator wie zum Beispiel Oxalsäure oder eine andere, mit dem Reagens-System verträgliche Säure der Testvorrichtung einverleibt und der Aldehyd wird vom Polyvinylalkohol getrennt gehalten, zum Beispiel durch Einschluss in Mikrokapseln. Selbstverständlich kann anstelle des Aldehyds auch die Säure isoliert gehalten werden, vorausgesetzt, dass der Aldehyd in Abwesenheit des Katalysators gegenüber dem Polyvinylalkohol genügend nichtreaktiv ist.

Auch Polymerausfällungen erwiesen sich als Inhibitor-Systeme für die Zwecke der Erfindung brauchbar. Beispiele hierfür sind die Ausfällung von Polyvinylalkohol aus Lösung durch Salze wie Na_2CO_3 , Na_2SO_4 und K_2SO_4 . Ferner können polymere Säuren wie Polyacrylsäure aus Lösung ausgefällt oder geliert werden mit Hilfe von Acetatsalzen von Schwermetallen oder mit anderen wasserlöslichen Quellen zweiwertiger Ionen, ferner durch Polyäthylenglycol.

Ein weiteres Polymer, das als Inhibitor-System für die Zwecke der Erfindung geeignet ist, ist Hydroxypropylcellulose («Klucel, Herst. Hercules, Inc.). Dieses Material kann mit sauren Polymeren wie hydrolysierten Maleinsäureanhydrid-Copolymeren oder Polyacrylsäure unter Verwendung von Verbindungen wie Dimethylolharnstoff, vorzugsweise bei niedrigem pH-Wert, vernetzt werden.

Ein weiteres, für die erfindungsgemässe Testvorrichtung geeignetes Gelierungssystem besteht aus Natriumcarboxymethylcellulose und Aluminiumionen.

Das Handelsprodukt «Gantrez AN», ein Methylvinyläther/Maleinsäureanhydrid-Copolymer der GAF-Corporation, kann in der Testvorrichtung in verschiedener Weise verwendet werden. Es bildet einen unlöslichen Komplex mit Polyvinylpyrrolidon bei einem pH-Wert unterhalb etwa 5. Ähnlich wie «Gantrez AN» verhält sich Polyacrylsäure gegenüber Polyvinylpyrrolidon. «Gantrez AN» bildet auch einen unlöslichen Komplex mit Gelatine in saurer Lösung. Ferner werden «Gantrez AN» und andere saure Polymere oder Copolymere durch Verbindungen wie Glycole, Polyvinylalkohol, Hydroxyalkylcellulosen und Diamine ausgefällt.

Wie bereits erwähnt, fallen auch andere Inhibitor-Systeme in den Rahmen der Erfindung. So kann man zum Beispiel auch Inhibitor-Systeme anwenden, die Reagens-System und Komponente im zu analysierenden Gemisch nicht physikalisch voneinander trennen. So wirkt beispielsweise ein temperatur-labiles Enzym in einem Reagens-System nicht, wenn die Temperatur zur Deaktivierung des Enzyms genügend hoch ist. Ein ein derartiges Enzym enthaltende Testvorrichtung kann daher an der Erzeugung einer nachweisbaren Reaktion nach einem vorbestimmten Zeitraum gehindert werden durch Anwendung eines Wärme erzeugenden Inhibitor-Systems.

Das Inhibitor-System kann auch ein Gift für das Reagens-System enthalten. So werden zum Beispiel Mercapto-Gruppen enthaltende Enzyme durch zweiwertiges Quecksilber deaktiviert, und allgemein werden Enzyme in Gegenwart starker Säuren und Basen wie Salzsäure und Natriumhydroxid deaktiviert. Beispiele für Enzyme, die durch zweiwertiges Quecksilber inhibiert werden, sind Glutamat-Decarboxylase, Lactat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Myokinase, alkalische Phosphatase, saure Phosphatase (pH 5,2), Aldehyd-Oxidase, Diaminosäure-Oxidase, β -Amylase, Kohlensäure-

reanhydrase, Cholinesterase, α -Glucosidase, β -Glucuronidase, Homogenisat-Oxidase, 3-Hydroxyanthranilat-Oxidase und Invertase. Auch die Einarbeitung derartiger Inhibitor-Systeme in die Testvorrichtung fällt in den Rahmen der Erfindung.

Ferner sind in der erfindungsgemässen Testvorrichtung temperatur-labile Enzyme, wie Salicylat-Hydroxylase, verwendbar. Stoffe, die bei Kontakt mit einer wässrigen Testprobe Wärme erzeugen, sind NaOH, AlCl_3 , TiCl_3 , Aluminiumalkyle und sonstige.

Eine Möglichkeit zur Verzögerung der Denaturierung oder Vergiftung eines Enzyms besteht in der Absonderung des Wärme erzeugenden und vergiftenden Inhibitor-Systems durch Mikrokapseln. Man kann ein wasserlösliches Kapselmaterial verwenden, das bewirkt, dass die Wärme erzeugenden Stoffe erst dann mit der Probe in Berührung kommen, wenn das Kapselmaterial sich gelöst hat. Zur Einkapselung eignen sich wasserlösliche Materialien wie Gelatine, Acrylamide, Styrol/Maleinsäure-Copolymere und Hydroxypropylcellulose und Gemische wie zum Beispiel ein Koazervat aus Gelatine und natürlichen oder synthetischen Polymeren.

Wie bereits erwähnt, eignen sich Mikrokapseln verschiedener Art besonders gut für die erfindungsgemässen Zwecke, wenn Bestandteile vorübergehend voneinander getrennt zu halten sind. Die Mikrokapseln können nach verschiedenen bekannten Methoden hergestellt werden, siehe zum Beispiel Angew. Chem. Internat. Edit. 14: 539 (1975) und dortiger Literaturnachweis. Verfahren wie Grenzflächen-Polykondensation, Koazervierung und dergleichen führen zur Bildung von Mikrokapseln. Ferner finden Verfahren wie Zentrifugieren, Sprühtrocknen und andere physiko-mechanischen Methoden Anwendung bei der Herstellung derartiger Mikrokapseln.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln ist die Grenzflächen-Polykondensation, die besonders einfach verläuft. Hierbei werden zwei Reagenzien (Co-Monomere oder Oligomere) an der Grenzfläche eines Mehrphasensystems zur Reaktion gebracht. Dabei erfolgt Polykondensation unter Bildung eines dünnen Polymerfilms, der in den die Monomeren enthaltenden Medien unlöslich ist. Geeignete Mikrokapseln mit osmotisch fragilen Wänden wurden hergestellt durch Lösen einer ersten Co-Monomer-Komponente, zum Beispiel eines polyfunktionellen Amids, in einer die abzusondernde Substanz enthaltenden wässrigen Phase. Die wässrige Phase besitzt vorzugsweise hohes spezifisches Gewicht oder Osmolalität, bezogen auf die erwartete Osmolalität der zu analysierenden Probe. Die wässrige Phase wird dann in einer mit Wasser nicht mischbaren Phase wie Mineralöl dispergiert oder emulgiert. Ein zweites Co-Monomer, zum Beispiel ein polyfunktionelles Säurehalogenid, wird dann der Suspension oder Emulsion zugegeben. Bestehen die Co-Monomeren aus polyfunktionellen Aminen und Säurehalogeniden, so entstehen Mikrokapseln aus Polyamid, von denen jede einen Teil der wässrigen Phase, d.h. die so isolierte Substanz, enthält.

Geeignete Polymermaterialien zur Herstellung osmotisch fragiler, semipermeabler Membranwände der Mikrokapseln sind ausser Polyamiden Polyester, Polyurethane, Polyharnstoffe und dergleichen.

Ein weiterer Weg zur Absonderung der Bestandteile des Inhibitor-Systems, von denen einer in Wasser und ein weiterer in organischen Lösungsmitteln löslich ist, besteht in der Anwendung eines «zweimaligen Tauchverfahrens». Dabei wird der Träger-Matrix einer Testverbindung zunächst eine wässrige Lösung des einen Bestandteils einverleibt, dann wird getrocknet und anschliessend wird eine zweite Lösung des zweiten Bestandteils in einem organischen Lösungsmittel einverleibt.

Bei einigen der vorstehend beschriebenen Inhibitor-Systemen, die keine Isolierung eines Bestandteils erfordern, zum Beispiel bei Verwendung von 2-Cyanacrylaten, mit Wasser schäumenden Isocyanaten und Epoxiden muss sowohl bei der Herstellung der Testvorrichtung als auch bei der Lagerung vor der Verwendung Feuchtigkeit ausgeschlossen werden. Dadurch wird eine Polymerisierung des Inhibitor-Systems bis zum Kontakt mit der Testprobe ausgeschlossen.

Zur Herstellung der erfindungsgemässen Testvorrichtung werden die gelierenden oder härtenden Inhibitorsysteme, die vorstehend durch typische Vertreter illustriert wurden, zusammen mit dem gewünschten Reagens-System einer Träger-Matrix auf beliebige geeignete Weise einverleibt. Zum Beispiel kann die Matrix in eine einzige Lösung sämtlicher Bestandteile der Reagens- und Inhibitor-Systeme eingetaucht werden. Benötigt man ein zweimaliges Eintauchen wegen der erforderlichen Isolierung einzelner Bestandteile, so wird die Matrix, wie bereits beschrieben, eingetaucht, getrocknet und erneut in eine weitere Lösung getaucht. Bei Verwendung von Mikrokapseln kann man diese mit Hilfe von Bindemitteln an der Matrix befestigen. Geeignete Bindemittel sind Celluloseacetat, Celluloseacetatbutyrat, Hydroxypropylcellulose und Polyvinylpyrrolidon. Die Bindemittel sollten mit der Testprobe nicht mischbar sein und die Absorption der Probe an der Matrix ermöglichen.

Als Träger-Matrix der erfindungsgemässen Testvorrichtung eignen sich Materialien wie Papier, Cellulose, Holz, Syntheschwarz-Vliese, Glasfaser- und andere Synthesepapiere, Polypropylenfilz, textile Vliese und Gewebe und dergleichen. Die Matrix wird zweckmässig in geeigneter Weise an einem konventionellen Trageglied, zum Beispiel einem Polymerstreifen, befestigt, um ihre Verwendung zu erleichtern.

Bei der Verwendung der Testvorrichtung wird die Matrix, der Reagens- und Inhibitor-System einverleibt sind, in die Testprobe eingetaucht. Man lässt den vorbestimmten Zeitraum ablaufen, dann wird die erkennbare Reaktion analysiert. Besteht die Reaktion aus einer Färbung oder Farbänderung, so wird die Vorrichtung mit einer Farbkarte verglichen. Besteht die Reaktion aus einer Veränderung der Lichtreflexion, so wird die Vorrichtung in einem geeigneten Lichtmessinstrument bekannter Art untersucht.

Beispiel 1

Eine 10.gew-%ige Lösung des 2-Cyanacrylsäuremethylester enthaltenden Haftmittels Eastman 910 (Eastman Chemical Products Inc., Kingsport, Tennessee, eine Tochtergesellschaft der Eastman Kodak Company) in Chloroform wird hergestellt und in einem dicht schliessenden Glasbehälter aufbewahrt. Eine Testvorrichtung zur Bestimmung von Glucose in Urin (ähnlich Clinistix) wird wie folgt hergestellt: Filterpapier Whatman 3MM wird mit einer Testreagens-Lösung gemäss den US-PS 2981 606 und 3 154 534 impägniert und dann getrocknet. Die Reagens-Lösung war wie folgt zusammengesetzt:

55 Clinistix	
destilliertes Wasser	758,1 ml
Äthanol-95 %	205,0 ml
Carageenan «Viscarin» (Herst. Marine Colloids Inc.)	2,5 g
60 Polyvinylpyrrolidon	25,0 g
Farbstoffe (FD & C., 3 und 4)	0,29 g
o-Tolidin · 2HCl	5,0 g
Zitronensäure (wasserfrei)	15,42 g
Natriumcitrat	67,92 g
65 «Gantrez AN-139»	7,5 g
oberflächenaktives Mittel	2,5 g
Glucoseoxidase	70,0 ml
Peroxidase	0,5 g

Ein Teil des so imprägnierten Papiers wurde dann mit der vorstehend beschriebenen Lösung imprägniert, ein weiterer Teil wurde nur mit Chloroform behandelt. Das Imprägniergefäß ermöglichte Einführung und Abziehen des Papiers, war jedoch zur Verminderung einer Chloroformverdunstung bedeckt. Überschüssige Imprägnierlösung konnte in Lösungsmittelreicher Atmosphäre in dem Gefäß vom Papier abtropfen. Nach Entfernung des Papiers aus dem Bad wurde das Lösungsmittel während 10 bis 30 Min. bei Raumtemperatur in einer Atmosphäre geringer Feuchtigkeit (weniger als 10% relative Feuchtigkeit) abdunsten gelassen.

Das mit Monomer imprägnierte Papier wurde im Dunkeln in trockener Atmosphäre gelagert und dann auf einem Plastik-Rücken befestigt und in die üblichen Streifen geschnitten. Die Streifen wurden in dunklen Glasflaschen in Gegenwart von Feuchtigkeit absorbierendem Silicagel gelagert.

Die Streifen wurden getestet, indem sie 3 Sek. lang in Urinproben bekannter Glucosekonzentration (0, 50, 100, 200 und 500 mg/dl) eingetaucht wurden, überschüssige Probe wurde entfernt und die Streifen wurden in ein Reflexionsmessgerät gelegt. Die Reflexionsmessungen bei 680 nm wurden als Funktion der Zeit aufgetragen ab $t = 15$ Sek., einschliesslich der Tauchzeit während 3,5 Minuten. Tabelle 1 zeigt die Veränderung der Reflexionswerte mit der Zeit und den Endwert für das auf Glucose spezifische Papier, welches mit 10% Eastman 910 imprägniert worden war, und zwar für mehrere Glucosekonzentrationen. Die Veränderung der Reflexion nach 15 Sek. bedeutet die Differenz zum Reflexionswert, wenn keine Glucose vorhanden ist. Man sieht, dass nach 2 Min. die Reflexion sich nicht mehr verändert. Diese Endfärbungen können visuell klar unterschieden werden und sie bleiben mehrere Tage bis mehrere Wochen, je nach den Lagerungsbedingungen, beständig.

Die nur mit Chloroform imprägnierten Vergleichsstreifen entwickelten eine sehr intensive Färbung nach einer Eintauchzeit von 10 Sek., und die Farbentwicklung setzte sich rasch fort. Nach 2 Min. waren die Streifen schwarz und es konnte keine Differenzierung vorgenommen werden.

Tabelle 1

Änderung der Reflexion mit der Zeit nach Kontakt mit der Probe

Glucose- konzentration (mg %)	15 Sek. Δ % R*	40 Sek. Δ % R+	65 Sek. Δ % R+	90 Sek. Δ % R+	115 Sek. Δ % R+	140 Sek. Δ % R+	165 Sek. Δ % R+	215 Sek. Δ % R+	End- wert % R
50	6,8	8,5	3,5	0,1	0	0	0	0	59
100	13,8	13,8	5,6	2,0	0,1	0	0	0	43
200	22,6	1+,3	6,2	2,7	0,7	0	0	0	31
500	30,8	15,7	6,5	2,7	0,7	0	0	0	22

* = %R bei $t = 15$ Sek. = $\%R_{(0 \text{ mg \% Glucose})} - \%R_{(n \text{ mg \% Glucose})}$.

+ = %R bei $t = t$ Sek. = $\%R_{(\text{vorhergehende } t)} - \%R_{(t)}$

Beispiel 2

Auf Glucose empfindliches Reagenspapier wurde nach der Vorschrift von Beispiel 1 mit einer Chloroformlösung imprägniert, die 10 Gew.-% Eastman 910 EM (2-Cyanacrylsäureäthylester), 1 Prozent (Gewicht/Volumen) festes, nicht-ionisches Detergens und 0,01% (Gewicht/Volumen) feste Disarbonsäure enthielt. Die aus dem so imprägnierten Papier hergestellten Streifen waren dem Produkt von Beispiel 1 ähnlich und die nach Umsetzung angefärbten Streifen besaßen ein gleichmässiges Aussehen.

Beispiel 3

Auf Ketone empfindliches Reagenspapier wurde nach der Vorschrift der US-PS 3 202 855 hergestellt, und zwar durch Eintauchen von Filterpapier Whatman 3MM in eine erste Lösung, Trocknen und Eintauchen in die zweite Tauchlösung:

1. Tauchlösung	
H ₂ O	722 ml
10 tribasisches Natriumphosphat	202,2 g
dibasisches Natriumphosphat (wasserfrei)	86,7 g
Aminoessigsäure	180,6 g
2. Tauchlösung	
15 Oberflächenaktive	1,64 g
Polyvinylpyrrolidon/Vinylacetat-Copolymer E-535	67 ml
Natriumnitroferricyanid	8,24 g
Dimethylsulfoxid	401 ml
20 Chloroform	350 ml
Äthanol, wasserfrei	200 ml

Die so hergestellten Streifen wurden dann mit einer Chloroform-Lösung imprägniert, die, wie in Beispiel 1, 10 Gew.-% Eastman 910 EM enthielt. Aus diesem imprägnierten Papier hergestellte Teststreifen ergaben bei der Bewertung mit verschiedenen Konzentrationen Acetessigsäure enthaltenden Urinen eine ausgezeichnete Farbentwicklung. Die die Acetessigsäurekonzentration des getesteten Urins anzeigende Farbintensität blieb stabil erhalten.

Beispiel 4

Auf Glucose empfindliches Reagenspapier wurde mit einer Benzollösung imprägniert, die 10% (2-Cyanacrylsäuremethylester enthaltendes) Eastman 910 enthielt. Bei der Bewertung erzielten Streifen dieses Papiers dieselben ausgezeichneten Eigenschaften wie die Produkte der vorangehenden Beispiele.

Beispiel 5

Ein System zum einmaligen Eintauchen wurde mit folgender Formulierung hergestellt:

Reagens A	
45 tribasisches Natriumphosphat	2,02 g
dibasisches Natriumphosphat (wasserfrei)	0,87 g
Glycin (Aminoessigsäure)	1,81 g
Natriumnitroferricyanid (gemahlen und getrocknet)	82,4 mg
50 Reagens B	
Diocetyl-natriumsulfosuccinat	8,4 mg
«Gafac RE-610» (oberflächenaktives Mittel der GAF Corp.)	8,0 mg
55 Chloroform	16,7 ml
«Hypol 2000» (Polyurethan-Vorpolymer) - Mischen bis in Lösung	0,9 g

Sämtliche Bestandteile von Reagens A wurden mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerkleinert und im Reagens B suspendiert. Trockenes Filterpapier Whatman 3MM wurde mit dieser Suspension imprägniert. Streifen aus dem so imprägnierten Papier wurden mit Urinen getestet, die verschiedene Acetessigsäurekonzentrationen enthielten. Die Farbintensität der so verwendeten Streifen war beständig und eine Funktion der Acetessigsäurekonzentration im getesteten Urin.

Beispiel 6

Ein Indikator auf Glucose und eine Enzymlösung folgender Zusammensetzung wurden hergestellt:

Indikator auf Glucose	
destilliertes Wasser	16,6 ml
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	9,5 ml
Kaliumjodid	1,5 g
FD & C Blau Nr. 1	5,3 mg
Zitronensäure	0,497 g
Trinatriumcitrat	2,182 g
(Äthylendinitrilo)-tetraessigsäurenatriumsalz	1,67 g
«Gantrez AN», 10%ige Lösung	5 ml
Enzymlösung	16,7 ml
Enzymlösung	
Glucoseoxidase	225 ml
Peroxidase	0,842 g

Sämtliche Reagenzien wurden vermischt, bis Lösung eingetreten war. Gleiche Volumente dieser Indikatorlösung, glucosehaltigen Urins und des Handelsproduktes «Hypol 2000» wurden in der Höhlung eines Plättchens mit einem Spatel vermischt, bis zum beginnenden Schäumen (etwa 1 Minute). Das Vorpolymer bildete innerhalb 3 bis 5 Min. eine gefärbten festen Schaum.

Das System ergab beim Erproben mit Urin, welcher 0, 100, 250, 500, 1000 bzw. 2000 mg Glucose/dl enthielt, nach kurzer Zeit eine stabile Färbung, wobei die Farbintensität die Glucosekonzentration anzeigte. Die Endfarben lagen von Blau über Grün bis Braun, je nach der Glucosekonzentration, sie wurden mit Farbstandards verglichen.

Da man mit einem Tropfen «Hypol 2000» genug Schaum erhält, um die Höhlung des Testplättchens auszufüllen, kann man den Versuch mit nur einem Tropfen Urin ausführen und trotzdem noch visuell auswerten.

Beispiel 7

Auf Keton empfindliches Reagens wurde nach der US-PS 3212855 hergestellt und mit einer 10%igen Chloroformlösung von «Hypol 2000» (mit Wasser schäumbares Urethan-Vorpolymer der Dewey and Almy Chemical Division der W.R. Grace Co.) imprägniert. Diese Lösung kann ausserdem verschiedene ionische Detergentien in einer Konzentration von 1 bis 5% des Vorpolymergewichts enthalten.

Aus dem so imprägnierten Papier hergestellte Streifen wurden mit Urinproben getestet, die verschiedene Mengen Acetessigsäure enthielten, wobei die endgültigen Farbintensitäten nach 2 bis 4 Min. erreicht wurden. Diese Farbintensitäten waren stabil und visuell klar als Funktion der Acetessigsäurekonzentration unterscheidbar.

Aus der vorangehenden Beschreibung ist ersichtlich, dass die Anwendung der Erfindung nicht nur auf die Herstellung von Teststreifen oder Testvorrichtungen zum Eintauchen und Ablesen anwendbar ist, sondern auch auf andere Versuchsanordnungen, einschliesslich solcher mit flüssigen Systemen.

Beispiel 8

Eine Testvorrichtung zur Bestimmung von Urobilinogen im Urin wurde hergestellt, wobei zunächst Filterpapier Whatman 3MM mit folgendem Gemisch imprägniert wurde:

5	destilliertes Wasser	70,5 g
	«Gantrez AN-139»	5,6 g
	Sulfasalicylsäure	9,16 g
	Caffein	7,05 g
10	Sulfaminsäure	1,41 g
	p-Dimethylaminobenzaldehyd	0,53 g
	(Äthylendinitrilo)-tetraessigsäure-Tetranatriumsalz	0,14 g
	Ascorbinsäure	3,52 g
15	Natriumlaurylsulfat	0,70 g

Das Papier wurde dann getrocknet und anschliessend mit einer 4 gew.-%igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon in Chloroform imprägniert. Anschliessend wurde das Papier getrocknet und auf Polystyrolstreifen befestigt. Die Reagensstreifen wurden getestet, indem sie 3 Sek. lang in Urinproben mit bekannter Urobilinogen-Konzentration (0, 4, 8 bzw. 12 Ehrlich-Einheiten) eingetaucht wurden. Die Färbung entwickelte sich innerhalb 2 Min. und war ein Hinweis auf die Urobilinogen-Konzentration. Dieser zeitabhängige Effekt wird erzielt durch die schnelle Komplexbildung zwischen hydrolysiertem Methylvinyläther/Maleinsäureanhydrid-Copolymer und Polyvinylpyrrolidon bei niedrigem pH-Wert.

30 Beispiel 9

Ein Streifen zur Auffindung von okkultem Blut im Urin wurde hergestellt durch Imprägnieren von Filterpapier Whatman 3MM mit folgender Lösung:

35	Natriumlaurylsulfat	0,84 g
	Cumol-hydroperoxid	1,67 g
	6-Methoxychinolin	0,39 g
	Natriumcitrat · 2H ₂ O	1,79 g
	Zitronensäure	2,32 g
40	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	0,45 g
	Triäthanolaminborat	5,58 g
	(Äthylendinitrilo)tetraessigsäure-Tetranatriumsalz	0,06 g
	Dimethylsulfon	5,58 g
45	Wasser	40,67 g
	Dimethylformamid	40,67 g

Nach dem Trocknen wurde das Papier mit einer 1 gew.-%igen Lösung von Eastman 910 EM in Chloroform imprägniert. Diese Streifen erzeugten bei der Bewertung in Urinproben mit bekannten Hämoglobinemengen (0, 0,016, 0,064, 0,16, 0,80 mg/dl) innerhalb 2 Min. eine bemerkenswert beständige Färbung, deren Intensität eine Funktion der Hämoglobinkonzentration war.

55