



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



- (21) Patentansøgning nr.: 4822/80
(22) Indleveringsdag: 12 nov 1980
(41) Alm. tilgængelig: 14 maj 1981
(44) Fremlagt: 18 sep 1989
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 13 nov 1979 US 093605

(51) Int.Cl.⁴ C 12 Q 1/54

- (71) Ansøger: *Miles Inc.; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46515, US
(72) Opfinder: Thomas Anthony *Magers; US, David Lee *Tabb; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Middel og testmateriale til påvisning af tilstedeværelsen af glucose i en forsøgsprøve

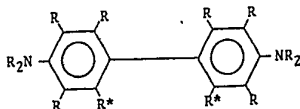
(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 376/76
US pat. nr. 3642444

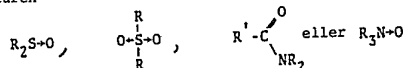
(57) Sammendrag:

4822-80

Et middel til påvisning af nærværelsen af en sukkerart i en forsøgsprøve omfatter en peroxidase, en sukkeroxidase og en chromogen forbindelse med formlen



i hvilken R og R*, der er ens eller forskellige, er hydrogen, lavere alkyl, lavere alkoxy, aryl eller aryloxy, eller i hvilken substituenterne R* tilsammen omfatter $(CH_2)_n$, hvor n er 1 eller 2, samt yderligere en virkningsforøgende forbindelse med strukturen



hvor R-substituenterne, der er ens eller forskellige, er som ovenfor angivet, eller hvor to af R-substituenterne bundet til et fælles atom tilsammen danner en lukket ring med fra 3 til ca. 6 atomer, hvilken ring er mættet, umættet eller aromatisk, og hvor R' betyder hydrogen eller en alkyl- eller alkenylgruppe med fra 1 til ca. 20 carbonatomer.

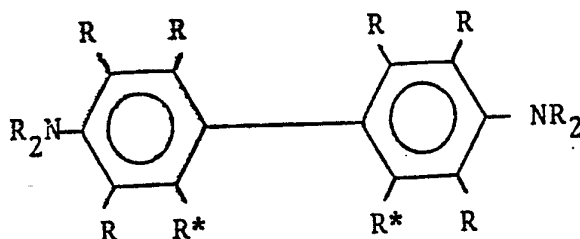
Et testmateriale til den nævnte påvisning omfatter en bærermatrix, der er inkorporeret sammen med det ovenfor nævnte middel.

Midlet og testmaterialet udviser overraskende høj sensitivitet over for lave glucosekoncentrationer, større blåfarvestabilitet ved høje glucosekoncentrationer eller begge dele, og midlet kan med fordel anvendes til påvisning af f.eks. glucose i urin.

0

Den foreliggende opfindelse angår et middel til påvisning af tilstedeværelsen af glucose i en forsøgsprøve, hvilket middel omfatter en peroxidase, glucoseoxidase og en chromogen forbindelse med strukturformlen

5



10

i hvilken R og R^{*}, der er ens eller forskellige, er hydrogen, lavere alkyl, lavere alkoxy, aryl eller aryloxy, eller i hvilken substituenterne R^{*} tilsammen omfatter (CH₂)_n, hvor n er 1 eller 2.

15

Opfindelsen angår også et testmateriale, der indeholder det her omhandlede middel, til påvisning af glucose i en forsøgsprøve, hvilket materiale omfatter et bærermateriale, hvori der er inkorporeret en peroxidase, glucoseoxidase og en chromogen forbindelse med den ovenfor angivne strukturformel.

20

Analysen af forsøgsprøver for tilstedeværelsen af sukkerarter finder anvendelse på mange områder, der ikke har indbyrdes forbindelse. Den foreliggende opfindelse har således relation til så forskellige grene af teknikken som bryggeriindustrien, biokemisk research og medicinsk diagnostik. I f.eks. bryggeriindustrien omdannes stivelse til sukkerarter, f.eks. maltose, inden den egentlige fermentering. Nærværelsen af maltose overvåges derfor omhyggeligt til sikring af høje udbytter ud fra kornudgangsmaterialet. Mange biokemiske systemer kræver glucose i omhyggeligt regulerede koncentrationer som deres celleenergikilde, og undersøgelsen af sådanne systemer

30 nødvendiggør, at disse koncentrationer overvåges nøje. I den medicinske profession anvendes sukkeranalyse i stor udstrækning til diagnosticering og kontrol med sådanne lidelser som diabetes mellitus, der viser sig ved abnormt høje glucose-

35 koncentrationer i blodet og i urinen.

0

Den foreliggende opfindelses anvendelsesmuligheder udstrækker sig således til højst forskellige felter. Opfindelsen kan udnyttes alle steder, hvor sukkeranalyser er eller bliver af signifikant betydning, det være sig ved brygning, i næringsmiddelindustrien, i videnskabelig research eller inden for medicinen.

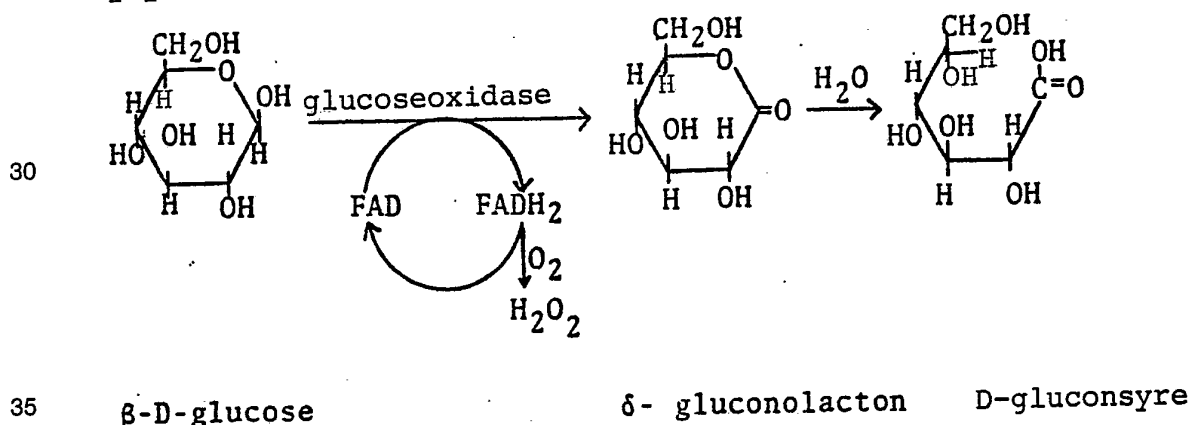
Sukkeranalysens historie er måske mest bemærkelsesværdig, fordi denne analysetype er blevet ændret drastisk gennem årene, både med hensyn til den anvendte grundlæggende kemi og med hensyn til omfanget. For det meste kan disse analyser karakteriseres som indebærende oxidationssystemer, der, når de reduceres, initierer reaktionsbetingelser, der fører til et detekterbart respons, f.eks. en farveændring eller ændring i bølgelængden af ultraviolet lys absorberet eller reflekteret af systemet. Reducerende sukkerarter vil således omdanne sølvoxid til metallisk sølv, og hvis en opløsning af sukkerarten påføres et stykke filterpapir imprægneret med sølvoxid, udvikles der en sort plet, jfr. F. Feigl, Chem. Ind., vol. 57, side 1161, London (1938). På lignende måde giver o-dinitrobenzen og 3,4- og 3,5-isomerene af dinitrophthalsyre en følsom farvereaktion (dannelse af violette toner) ved opvarmning med reducerende sukkerarter i Na_2CO_3 , jfr. T. Momose et al., Chem. Pharm. Bull. Tokyo, vol. 12, side 14 (1964), og F. Feigl, Spot Tests in Organic Analysis, 7th Ed., side 338-339, Elsevier Publ. Co., New York (1966).

Så tidligt som i 1849 var det imidlertid kendt, at reducerende sukkerarter ville forårsage fældning fra en alkalisk opløsning af CuSO_4 af det gule til røde kobber(I)oxid (eller oxyhydrat), jfr. H. Fehling, Ann., vol 72 (1849), se også B. Herstein, J. Am. Chem. Soc., vol 32, side 779 (1910). Denne tidlige milepæl, der er kendt som Fehling's prøve, gav incitament til udviklingen af en langt mere følsom prøve, ved hvilken der anvendes sølvoxid i ammoniak, det såkaldte Tollens' reagens, der reagerer let med reducerende midler til dannelse af en sort fældning af metallisk sølv, som ofte dan-

ner et spejl på de indre vægge af glasreaktionsbeholdere, jfr. B. Tollens, Ber., vol. 14, side 1950, (1881), samt vol. 15, side 1635 og 1828 (1882).

På grund af den forholdsvis store hyppighed af diabetes mellitus og denne lidelses ledsagende alvorlige kliniske konsekvenser er der fra de biologiske og medicinske professioner udvist stor interesse i nye metoder til analyse af glucoseniveauer i urin og serum. Denne dybe interesse har ført til udviklingen af flere nye metoder, der afviger drastisk fra deres opløsningskemiske forgængere. Ved disse metoder anvendes der særligt udtænkte biokemiske systemer, der kan inkorporeres i tørre "dyp-og-aflæs"-materialer, anvendes i opløsnings- eller suspensionsteknik eller i forbindelse med spektrofotometre eller andet apparatur.

Blandt disse nye metoder bygger opfindelsen på et enzymatisk system, hvori analyten, glyucose, er et substrat for et bestemt enzym, idet reaktionsprodukterne er i stand til at fremkalde et detekterbart respons fra en familie af indikatorforbindelser, der groft betegnet kendes som "indikatorer af benzidintypen". Disse skal defineres nærmere i det følgende, men det er her tilstrækkeligt at anføre, at disse forbindelser undergår farveændringer i nærværelse af hydrogenperoxid og enzymet peroxidase. Glucose-glyucoseoxidase-systemet er et eksempel på den kendte teknik, ifølge hvilken glucose oxideres til glyconsyre under samtidig dannelse af H_2O_2 i overensstemmelse med ligningen:



0

Det er den samtidige dannelse af hydrogenperoxid, der sammen med de følgende, indikator-relaterede trin, fører til iagttagelig farvedannelse eller et andet detekterbart respons. En indikator af benzidintypen giver således respons i nærværelse af hydrogenperoxid og peroxidase ved ændring af sin lysabsorptionsevne.

I praksis anvendes denne teknologi i øjeblikket til glucoseanalyse i form af "dyp-og-aflæs"-strimler såsom de, der markedsføres af Ames Division of Miles Laboratories, Inc., under varemærket CLINISTIX[®] og andre. Stort set omfatter disse en plaststrimmel, ved hvis ene ende der er anbragt en absorberende papirdel imprægneret med de anvendte enzymer, indikatorforbindelse og puffermidler som de aktive hovedbestanddele. De anvendes ved dypning af den reagens-bærende ende i forsøgsprøven, fjernelse deraf og sammenligning af den farve, der er dannet i papiret, med et standard-farvekort, der er kalibreret til forskellige glucosekoncentrationer.

Skønt mekanismen ved farvedannelse ved benzidintype-indikatorer i nærværelse af H_2O_2 og peroxidase ikke er kendt med fuldstændig sikkerhed, er det kendt, at der fremkommer to efter hinanden følgende farveformer: en første art, der har blå farve, og en anden, der er brun. Eftersom den blå art har tendens til at være en overgangsform, der til slut metamorfoseres til den brune, er det nødvendigt at iagttage farveændringen i en bestemt, foreskrevet tid. I modsat fald mistes den sande signifikans af farveændringen, idet svage skær af blå, der let kan skelnes, giver plads for de mindre let interpreterede brune toner. Jo højere sukkerkoncentrationen er i forsøgsprøven, desto mere alvorligt bliver dette problem på grund af vanskeligere detektering ved de højere områder af sukkerkoncentrationer. Det ses således, at det er i høj grad fordelagtigt at forøge varigheden af den blå farveart, hvorved man tillader større differentiering mellem sukkerkoncentrationer og tillige tilvejebringer højere grænser for de detekterbare koncentrationsområder.

0

Da endvidere analytiske hjælpemidler såsom reagensstrimler ikke anvendes umiddelbart efter fremstillingen, men sædvanligvis opbevares i forholdsvis lange tidsrum, og da en for lang tid mellem fremstilling og anvendelse kan resultere i et tab af effektivitet, kan en forøget opbevaringsbestandighed være en udtalt fordel: jo bedre opbevaringsbestandighed, desto mere på-

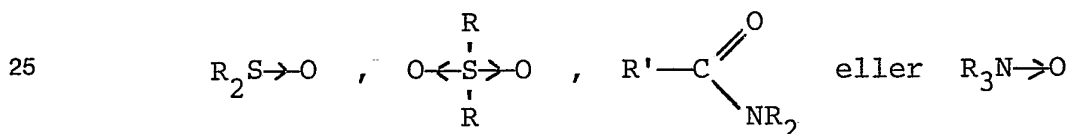
10 Opfindelsen angår således et glucose-sensitivt middel og testmateriale, hvori der gøres brug af det ovenfor beskrevne, kendte enzym-benzidintype-indikator-system. Opfindelsen går imidlertid ud over dette system ved at tilvejebringe forbedret stabilitet af den intermediære blå farveform samt forøget opbevaringstid, dvs. oplagringsbestandighed.

Der er blevet meddelt adskillige patenter, der kan an-
15 ses for relevante i forbindelse med den foreliggende opfindelse. I USA-patentskrift nr. 2.848.308 beskrives den grundlæggende enzymkemi, ifølge hvilken glucoseoxidase, peroxidase og en indikator af benzidintypen anvendes i en reagensstrimmel til bestemmelse af glucose i urin eller en anden legemsvæske. I
20 USA-patentskrift nr. 3.753.863 beskrives anvendelsen af lavere alkan-polyoler til "stabilisering" af indikatoropløsninger af benzidintypen. I USA-patentskrift nr. 4.071.317 beskrives stabiliseringen af et for okkult blod sensitivt middel ved anvendelse af visse sulfon-, sulfoxid- og amidforbindelser som fortyndingsmidler under fremstillingen af midlet. Dette sidstnævnte middel omfatter en organisk hydroperoxidforbindelse og en indikatorforbindelse, f.eks. af benzidintypen. I USA-patentskrift nr. 3.642.444 er der beskrevet et reagens til analyse af aldohexoser og aldopentoser, hvilket reagens indeholder di-
30 methylsulfoxid og en aromatisk amin, og i dansk patentansøgning nr. 376/76 er der beskrevet et middel og et testmateriale til påvisning af glucose eller galactose, hvilket middel henholdsvis materiale indeholder glucoseoxidase eller galactoseoxidase, peroxidase, en chromogen forbindelse som oven-
35 for angivet samt celluloseacetatphthalat.

0

Til opsummering af teknikken stude forud for nærværende opfindelse kan det anføres, at sukker-sensitive kemiske reaktioner begyndte at vise sig på det analytiske område så tidligt som i midten af det 19. århundrede med fremkomsten af Fehling's opløsning og Tollens' reagens. De fleste af de "rent kemiske systemer", der siden er fremkommet, er i vid udstrækning blevet overlejet af biokemiske systemer, især de, der omfatter en sukkeroxidase, peroxidase og en peroxid-sensitiv indikator af benzidintypen. Disse sidstnævnte indikatorforbindelser er blevet angivet at blive stabiliseret ved nærværelsen af lavere alkyl-polyoler. Endelig angives det, at et middel, der er sensitivt over for nærværelsen af okkult blod i urin, kan stabiliseres, såfremt det fremstilles i nærværelse af visse sulfon-, sulfoxid- og/eller amidforbindelser. Imidlertid er der i den kendte teknik intet, der leder tanken hen på det her omhandlede glucose-sensitive middel og testmateriale.

Sagt i korthed angår opfindelsen et forbedret middel og testmateriale til bestemmelse af glucose i en forsøgsprøve. Midlet, der er af den i det foregående angivne art, er ejendommeligt ved, at det yderligere omfatter en virkningsforøgende forbindelse med strukturformlen



hvor R-substituenterne, der er ens eller forskellige, er som ovenfor angivet, eller hvor to af R-substituenterne bundet til et fælles atom tilsammen danner en lukket ring med fra 3 til ca. 6 atomer, hvilken ring er mættet, umættet eller aromatisk, og hvor R' betyder hydrogen eller en alkyl- eller alkenylgruppe med fra 1 til ca. 20 carbonatomer.

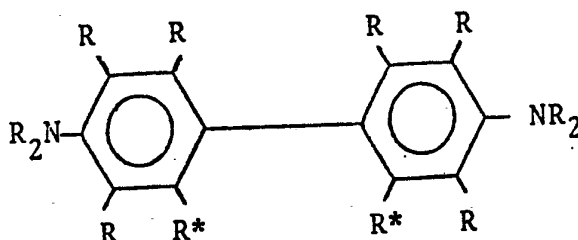
Testmaterialet ifølge opfindelsen, der er af den i det foregående angivne art, er ejendommeligt ved, at der i bærer-

35

0 materialet yderligere er inkorporeret en virkningsforøgende forbindelse som ovenfor defineret, og påvisningen sker ved at bringe forsøgsprøven i kontakt med midlet eller testmateriale, hvorpå man iagttager ethvert detekterbart respons.

5 Det her anvendte udtryk "lavere alkyl" betyder en alkylgruppe med fra 1 til ca. 6 carbonatomer, herunder methyl, ethyl, propyl, isopropyl, cyclopropyl, butyl, isobutyl, tert.butyl, cyclobutyl og alle pentyl- og hexylisomere. Ved "lavere alkyloxy" skal der forstås ethergruppen R-O-, hvor R
10 er lavere alkyl. "Aryl" betegner phenyl eller med lavere alkyl substitueret phenyl.

Nøglen til tilvejebringelsen af et detekterbart respons på tilstedeværelsen af glucose-analyten under anvendelse af glucoseoxidase-metoden er kombinationen af peroxid
15 og indikator af benzidintypen. Som følge heraf indeholder midlet ifølge opfindelsen ud over glucoseoxidase og enzymet peroxidase en chromogen indikatorforbindelse af benzidintypen. Betegnelsen "indikator af benzidintypen" skal betegne enhver forbindelse med strukturformlen



hvor R, R^{*}, der er ens eller forskellige, er hydrogen, lavere alkyl, lavere alkyloxy, aryl eller aryloxy, eller hvor substituenterne R^{*} tilsammen omfatter (CH₂)_n, hvor n er 1 eller 2. Sådanne forbindelser omfatter benzidin, o-tolidin, 2,7-
30 -diaminofluoren, en 3,3',5,5'-tetra-(lavere alkyl)-benzidin, f.eks. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, i det følgende kaldet tetramethylbenzidin, og de forskellige N-substituerede benzidinderivater.

Den virkningsforøgende forbindelse i det forbedrede glucosepåvisningsmiddel kan antage fire grundlæggende strukturer
35

0

som angivet i det foregående. Blandt de forbindelser, der bedømmes som særligt egnede, er dimethylsulfon, dimethylsulfoxid, pentamethylensulfoxid, formamid, N,N-dimethylformamid, acetamid, N,N-dimethylacetamid, N,N-di-(β -hydroxyethyl)-acetamid, cocoyldiethanolamid, talloyldiethanolamid, tallowyldiethanolamid, trimethylaminoxid, pyridin-1-oxid, 3-hydroxypyridin-1-oxid, 4-methylpyridin-1-oxid og 2-chlorpyridin-1-oxid. Disse forbindelser repræsenterer naturligvis ikke alle de virkningsforøgende forbindelser, der falder ind under den angivne definition, og man er i øjeblikket ikke bekendt med nogen forbindelse, som tilfredsstiller de foregående kriterier, men som ikke giver de omhandlede virkninger med hensyn til forbedret farvestabilitet og forøget opbevaringsstabilitet.

Med "cocoyldiethanolamid" menes amidet af diethanolamin og en fedtsyreblanding, hvilket er kommercielt tilgængeligt som Ninol[®] 2012 Extra og fremstilles af Stepan Chemical Company, Northfield, Illinois. Med "talloyldiethanolamid" menes amidet af diethanolamin og tallolie, hvilket er tilgængeligt som Ninol[®] 1301, og med "tallowyldiethanolamid" menes amidet af diethanolamin og talgolie, hvilket er tilgængeligt som Ninol[®] 201; begge de sidstnævnte produkter fra Stepan Chemical Company.

Glucoseanalyser udført under anvendelse af det her omhandlede middel kan udføres på flere måder. En opløsning eller suspension af midlet i vand eller et andet egnet opløsningsmiddel kan anvendes, idet en portion af forsøgsprøven kan sættes dertil. Alternativt kan en portion af midlet sættes til en pletpladeudboring eller et pletpladehul indeholdende en forsøgsprøve, der skal undersøges.

En tredje måde til analysen består i at anvende et bærermateriale, hvori midlet er inkorporeret. Et sådant materiale omfatter almindeligvis en aflang plaststrimmel, på hvis ene ende der er monteret en bærermaterialedel, hvori midlet er inkorporeret, idet den anden ende af strimlen tjener som håndgreb. Plaststrimmeldelen måler almindeligvis ca.

0

8 x 0,5 cm, idet bærer materialedelen har dimensioner på ca. 0,5 x 0,5 cm, omend disse dimensioner på ingen måde er kritiske.

Det bærer materiale, der anvendes til udformningen af testmaterialet, kan antage mangfoldige former. I USA-patentskrift nr. 3.846.247 beskrives således anvendelsen af filt, porøse keramiske strimler og vævede eller mattede glasfibre. Yderligere beskrives der i USA-patentskrift nr. 3.552.928 anvendelsen af små absorberende træstykker, klæde, svampemateriale og leragtige stoffer. Anvendelsen af fiberflor af syntetisk harpiks og af glasfiberfilt som bærer materiale er foreslået i britisk patentskrift nr. 1.369.139. I et andet britisk patentskrift nr. 1.349.623, foreslås anvendelsen af et lyspermeabelt netværk af tynde filamenter som dække for et underliggende papirmateriale. Polyamidfibre foreslås i fransk patentskrift nr. 2.170.397. Til trods for disse forslag er det materiale, der overvejende anvendes i teknikken som bærer materiale, og som er særlig egnet i forbindelse med den foreliggende opfindelse, et sugende papir såsom filterpapir. Det vil således ses, at der forefindes en lang række muligheder med hensyn til udvælgelsen af et egnet materiale til brug som et bærer materiale, og at dette kan antage forskellige fysiske former. Alle disse typer skal betragtes som værende inden for opfindelsens rammer.

Testmidlet kan inkorporeres i et bærer materiale på mange måder, der er kendt for en person med rimeligt kendskab til området. En måde er at lede et væv af bærer materialet gennem et imprægneringsbad indeholdende testmiddelbestanddelene, således at materialet bliver grundigt gennemmættet med imprægneringsopløsning. Det mattede materiale tørres derpå, f.eks. i en ovn ved 50°C, hvorved man opnår testmidlet inkorporeret i materialet.

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning af opfindelsen, herunder de foretrukne udførelsesformer for denne.

35

0

Eksempel 1-12

Forskellige virkningsforøgende forbindelser og deres virkninger på et glucose-sensitivt reagenssystem.

5

Der udføres forsøg under anvendelse af et glucose-sensitivt reagenssystem indeholdende glucoseoxidase, peroxidase og o-tolidin i vand. Til aliquoter af denne blanding sættes der lige store vægtmængder af forskellige virkningsforøgende forbindelser, idet én aliquot anvendes som kontrol.

10

Det til grund liggende reagenssystem indeholder følgende bestanddele.

15

20

25

30

35

0

	o-Tolidin·2 HCl	0,50 gram (g)
	Poly(vinylpyrrolidon)	
	(10 vægtprocent i vand)	60,0 milliliter (ml)
5	ON [®] 870 polyethoxylet fedtalkohol	
	(General Aniline & Film Corp.)	0,50 g
	Ethanol (denatureret med 5 ml	
	methanol pr. 100 ml)	36,0 ml
	Tris-puffer *	47,0 ml
10	Gantrez [®] AN-139 (copolymer af malein-	
	syreanhydrid og vinylether fra	
	G.A.F. Corporation) (10 vægt% i vand)	15,0 ml
	Ascorbinsyre (10 vægtprocent i vand)	0,5
	Glucoseoxidase i vand (5000 I.U. pr.	
15	ml, fra Marschall Division af Mi-	
	les Laboratories, Inc.)	15,0 ml
	Peberrods-peroxidase (68 I.U. pr.	
	milligram, fra Miles Laboratories,	
	Inc.)	0,50 g
20	Destilleret vand	26,5 milligram (mg)

* En blanding bestående af:

	Vand	208,0 ml
	Tris-hydroxymethylaminomethan	
25	(Fisher Scientific)	22,5 g
	Trisnatriumcitrat	27,2 g
	Glutaminsyre	27,0 g
	Citronsyre	6,16 g

30

35

0

Den resulterende blanding opdeles i 12 aliquoter på hver 19 ml, og til 11 af disse aliquoter sættes der resp. 0,1 g af hver af de specifikke virkningsforøgende forbindelser, der er angivet i tabel I, idet den tolvte aliquot tjener som kontrol.

5

En 1,0 ml portion af hver fremstillet aliquot samt kontrolprøven uden nogen virkningsforøgende forbindelse anbringes hver i særskilte udboringer eller huller i en pletplade. Til hver portion sættes der derpå en ringe mængde af en vandig opløsning af glucose (1,0 vægt% i vand), idet der tilsættes en indledende dosis på 1 microliter (μ l), og man iagttager enhver farvedannelse og den tid, det tager for denne at fremkomme. Der fortsættes med tilsætning af glucose til bestemmelse af den totale mængde, der er nødvendig til at frembringe en brun farvedannelse i pladeudboringen. Glucosetilsætningen udføres under anvendelse af en kalibreret injektionssprøjte (Hamilton Series No. 700, kapacitet 10 μ l). Mængden på 1 μ l tilsættes omgående på én gang. Der tilsættes ikke mere glucose, førend tiden for den blå farvedannelse er noteret. Den yderligere glucose tilsættes derefter, i hvert enkelt tilfælde i løbet af mindre end

15

20 60 sekunder.

25

30

35

Tabel I

Eksempel nr.	Virkningsforøgende additiv	Indledende blå farvedannelse (1 µl glucose)	Glucose nødvendig inden brunfarvning
1	Kontrol	Blå ring dannet omkring kanten af hullet efter 60 sek.	20 µl
2	Ninol ^(R) 1301*	Blå ring efter 30 sek.	70 µl
3	Ninol ^(R) 2012 Extra*	Blå pletter - øjeblikkeligt	90 µl
4	Urinstof	Overflade blå - 60 sek.	30 µl
5	N,N-dimethylformamid	Blå pletter - øjeblikkeligt	70 µl
6	Dimethylsulfon	Blå pletter - øjeblikkeligt	68 µl
7	Dimethylsulfoxid	Blå overflade - 10 sek.	50 µl
8	Tetramethylensulfon	Blå overflade - 10 sek.	80 µl
9	4-Methylpyridin-1-oxid	Overflade blå - 7 sek.	35 µl
10	3-Hydroxypyridin-1-oxid	Overflade blå - 7 sek.	42 µl
11	2-chlorpyridin-1-oxid	Blå ring efter 5 sek.	45 µl
12	Trimethylaminoxid	Overflade blå - 5 sek.	28 µl

* Stepan Chemical Company, Northfield, Illinois

0

Tabel I viser de opnåede data for 11 præparater ifølge opfindelsen og for kontrolpræparatet. Hver af de afprøvede virkningsforøgende forbindelser resulterede i en markant forbedring i forhold til standard-glucosepræparatet. Eksemplerne 2-12 (ifølge opfindelsen) viser således indledende blå farvedannelse ved indledende glucose-inokulering efter kun 0-10 sekunder (urinstof, der er en undtagelse, kræver 60 sekunder, jfr. eksempel 4), medens der ifølge eksempel 1 (kontrol) uden tilsætning først forekommer indledende blå farvedannelse efter 60 sekunder. Disse data viser, at de virkningsforøgende forbindelser markant forøger sensitiviteten af kontrolsystemet i forbindelse med små glucosekoncentrationer.

Tabel I viser yderligere uventede fordelagtige resultater. De data, der vedrører dannelsen af den brune farveform af o-tolidin (højre kolonne), viser, at denne uønskede indikator-manifestation ophæves drastisk, når en af de her omhandlede virkningsforøgende forbindelser er til stede, medens de angivne kontroldata viser brunfarvning efter tilsætning af en forholdsvis ringe mængde glucose. I eksempel 1 (kontrol) fremkommer der således brunfarvning efter tilsætning af 20 µl af glucosen, hvorimod ifølge eksemplerne 2-12 brunfarvning først forekommer efter tilsætning af 28-90 µl af glucoseopløsningen.

Til sammenfatning af signifikansen af eksemplerne 1-12 kan det anføres, at de virkningsforøgende forbindelser forbedrer reagenset ifølge den nuværende kendte teknik til glucosebestemmelse ved (a) frembringelse af den indledende blå farve betydeligt hurtigere, hvilket betyder forbedret sensitivitet for lave koncentrationer af glucose, og (b) forsinkelse af påbegyndelsen af uønsket brun farvedannelse, indtil der tilsættes meget større mængder glucose. De virkningsforøgende forbindelser forbedrer således kontrolpræparatets respons på såvel høje som lave glucosekoncentrationer.

35

0

Eksempel 13-24

Testmaterialer fremstillet ud fra midlerne ifølge eksempel 1-12.

De 12 ovenfor omtalte aliquoter, der indeholdt opløsningerne ifølge eksemplerne 1-12, anvendes til fremstilling af testmaterialer. Hvert materiale omfatter en strimmel Trycite[®] (polystyren) med størrelsen ca. 8 x 0,5 cm, og til den ene ende af strimlen er der fastgjort et kvadrat af Eaton and Dikeman 204 filtrerpapir med målene 0,5 x 0,5 cm. Dette papirbæreremateriale fastgøres til den anvendte Trycite[®] under anvendelse af Double-Stick[®], en dobbeltsidet adhæsiv strimmel, der kan fås fra 3M Company. Når strimlerne således er fremstillet, dyppes et særskilt sæt strimler i hver opløsning ifølge eksemplerne 1-12 og tørres ved 50°C i en luftovn i ca. 10 minutter, hvorved der frembringes ét kontroltestmateriale (reagens fra eksempel 1) og 11 sæt testmaterialer ifølge den foreliggende opfindelse (reagenser ifølge eksemplerne 2-12).

Hvert sæt reagens-bærende materialer afprøves derpå ved dypning af reagens-delene deraf i glycose-testopløsninger med forskellige koncentrationer til fastlæggelse af tærskel-glucosekoncentrationer for fremkomsten af de blå og brune farveformer af o-tolidin-indikatoren. Til dette formål anvendes der testopløsninger af glucose i vand med koncentrationer på 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 og 5000 milligram glucose pr. deciliter (mg/dl). De fremkomne data for de respektive sæt af testmaterialer fremgår af den følgende tabel II.

30

35

Tabel II

Eksempel nr.	Virkningsforøgende middel	Tærskel-glucosekon- tration - blå (mg/dl)	Tærskel-glucosekoncen- tration - brun (mg/dl)
13	Kontrol	(20-30) meget svagt blå	(1000)
14	Ninol (R) 1301	(20) meget let blå	(5000)
15	Ninol (R) 2012 Extra	(20) lyseblå	midnatsblå 5000 mg/dl
16	Urinstof	(20) blå	(2000)
17	N,N-dimethylformamid	(20) påfugleblå	(2000)
18	Dimethylsulfon	(20) middelblå	(5000)
19	Dimethylsulfoxid	(20) middelblå	(2000)
20	Tetramethylensulfon	(20) kongeblå	midnatsblå 5000 mg/dl
21	4-Methylpyridin-l-oxid	(30) lyseblå	(2000)
22	3-Hydroxypyridin-l-oxid	(30) middelblå	(5000)
23	2-Chlorpyridin-l-oxid	(30) middelblå	midnatsblå 5000 mg/dl
24	Trimethylaminoxid	(30) lyseblå	(1000)

0

De i tabel II angivne data viser klart, at der opnås et i høj grad forbedret glucose-sensitivt testmateriale ved anvendelse af de her omhandlede virkningsforøgende forbindelser. Kontrolmaterialerne ifølge eksempel 13 udviser en næppe skelnelig blå tone ved dypning i glucoseopløsningen med 20 mg/dl og begynder at blive brun ved 1000 mg/dl glucose. Alle de andre sæt materialer fra eksemplerne 14-24 giver bedre resultater. Når der f.eks. sættes Ninol[®] 2012 Extra, 2-chlor-pyridin-1-oxid og tetramethylensulfon, jfr. eksempel 15, 23 og 20, til præparatet, fremkommer der aldrig nogen brun farve, selv ved en glukosekoncentration på 5000 mg/dl. Endvidere er den indledende blå farve, der fås med materialerne ifølge eksemplerne 14-24, hver gang mørkere end farven fra eksempel 13, kontrollen. I alle de tilfælde, hvor reagenssammensætningen indeholder en virkningsforøgende forbindelse, udviser det resulterende materiale bedre sensitivitet over for lav glukosekoncentration, større blåfarvestabilitet ved høje glukosekoncentrationer, eller begge dele.

20

25

30

35

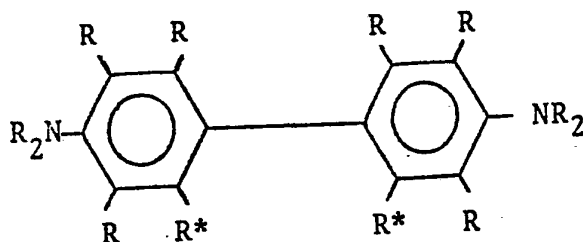
0

P a t e n t k r a v .

5

1. Middel til påvisning af tilstedeværelsen af glucose i en forsøgsprøve, hvilket middel omfatter en peroxidase, glucoseoxidase og en chromogen forbindelse med strukturform-

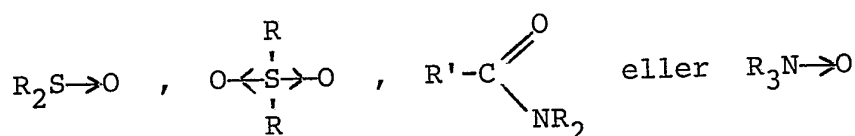
10



15

i hvilken R og R^{*}, der er ens eller forskellige, er hydrogen, lavere alkyl, lavere alkoxy, aryl eller aryloxy, eller i hvilken substituenterne R^{*} tilsammen omfatter (CH₂)_n, hvor n er 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at midlet yderligere omfatter en virkningsforøgende forbindelse med strukturformlen

20



25

hvor R-substituenterne, der er ens eller forskellige, er som ovenfor angivet, eller hvor to af R-substituenterne bundet til et fælles atom tilsammen danner en lukket ring med fra 3 til ca. 6 atomer, hvilken ring er mættet, umættet eller aromatisk, og hvor R' betyder hydrogen eller en alkyl- eller alkenylgruppe med fra 1 til ca. 20 carbonatomer.

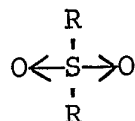
30

2. Middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den virkningsforøgende forbindelse er R₂S → O.

35

3. Middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den virkningsforøgende forbindelse er

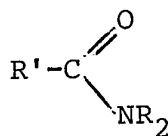
0



5

4. Middel ifølge krav 1, kendet ved, at den virkningsforøgende forbindelse er

10



5. Middel ifølge krav 1, kendet ved, at den virkningsforøgende forbindelse er $\text{R}_3\text{N} \rightarrow \text{O}$.

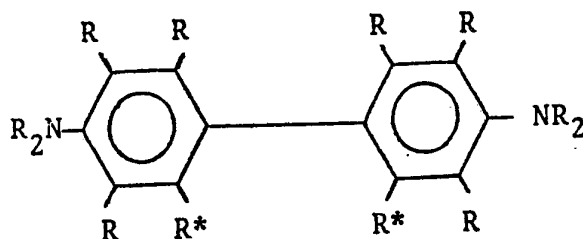
15

6. Middel ifølge krav 1-5, kendet ved, at den chromogene forbindelse er tetramethylbenzidin.

20

7. Testmateriale indeholdende et middel ifølge krav 1 til påvisning af glucose i en forsøgsprøve, hvilket materiale omfatter et bærermateriale, hvori der er inkorporeret en peroxidase, glucoseoxidase og en chromogen forbindelse med strukturformlen

25

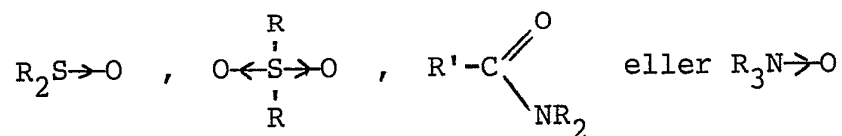


30

i hvilken R og R^* , der er ens eller forskellige, betyder hydrogen, lavere alkyl, lavere alkoxy, aryl eller aryloxy, eller hvor substituenterne R^* tilsammen omfatter $(\text{CH}_2)_n$, hvor n er 1 eller 2, kendet ved, at der i bærer materialet yderligere er inkorporeret en virkningsforøgende forbindelse med strukturen

35

0



5 hvor R-substituenterne, der er ens eller forskellige, er som
 ovenfor angivet, eller hvor to af R-substituenterne bundet
 til et fælles atom tilsammen danner en lukket ring med fra
 3 til ca. 6 atomer, hvilken ring er mættet, umættet eller
 aromatisk, og hvor R' betyder hydrogen eller en alkyl- eller
 10 alkenylgruppe med fra 1 til ca. 20 carbonatomer.

8. Testmateriale ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t
 ved, at den chromogene forbindelse er tetramethylbenzidin.

15

20

25

30

35