



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **Nr. 161346**

(51) Int. Cl.⁴ **G 01 N 31/22, 33/52**

(21) Patentsøknad nr. **841745**

(22) Inngivelsesdag **02.05.84**

(24) Løpedag **02.05.84**

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **MILES INC.,**
P.O. Box 40, 1127 Myrtle Street,
Elkhart, IN 46515, USA.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(83) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra **13.11.84**

(44) Utlegningsdag **24.04.89**

(72) Oppfinder **STEVEN C. CHARLTON, Elkhart, IN,**
USA.

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

(30) Prioritet begjært **12.05.83, US, nr. 493982.**

(54) Oppfinnelsens benevnelse **PRØVEENHET FOR Å BESTEMME TILSTEDEVÆRELSEN AV ET ION
I EN VANDIG PRØVE SAMT ANVENDELSE AV PRØVEENHETEN FOR
Å BESTEMME TILSTEDEVÆRELSEN AV ET ION I EN VANDIG PRØVE.**

(57) Sammendrag

En prøveenhet for å bestemme tilstedeværelsen av et ion i en vandig prøve, samt en prøveinnretning som inneholder prøveenheden, en fremgangsmåte for fremstilling derav og en fremgangsmåte for å bruke den. Prøveenheden omfatter en hydrofil bærergrunnmasse iblandet finfordelte dråper av et hydrofobt hjelpemiddel. Det hydrofobe hjelpemiddel inneholder en ionofor som er istand til å danne et kompleks med ionet, og et rapportørstoff som er istand til ved gjensidig påvirkning med komplekset av ionofor og ion å gi en påvisbar respons.

Prøveinnretningen omfatter en avlang bærerdel med en øvre, i det vesentlige plan overflate, idet prøveenheden er festet til den plane overflaten av bærerdelen.

Fremgangsmåten for å fremstille innretningen omfatter å lage en første blanding av vann og en hydrofil polymer, lage en andre blanding av et hydrofobt hjelpemiddel, en ionofor som er istand til å danne et kompleks med ionet, og et rapportørstoff som er istand til ved gjensidig påvirkning med komplekset av ionoforen og ionet å gi en påvisbar respons, blande den første og den andre blandingen til en stabil emulsjon av finfordelte dråper av den andre blandingen i den første blandingen, belegge emulsjonen på en avlang bærerdel med en øvre, i det vesentlige plan overflate, og fordampe vannet fra emulsjonen slik at det fås en hydrofil bærergrunnmasse iblandet finfordelte dråper av den andre blandingen, idet grunnmassen derved festes til den plane overflaten av bærerdelen.

(56) Anførte publikasjoner

Europeisk (EP) patentsøknad, publ.nr. 128317, 128318, 41175, 10615,
Britisk (GB) patent nr. 1271209.
-S.C. Charlton et al: "Solid-phase Colorimetric Determination of Potassium",
Chemical Chemistry, Bind 28(9), 1957-61, 1982.

Fremgangsmåten for å bruke prøveenheden eller -innretningen omfatter å bringe den i kontakt med prøven og observere påvisbar respons.

Oppfinnelsen vedrører en prøveenhet for å bestemme tilstedeværelsen av et ion i en vandig prøve samt anvendelsen av prøveenhetsen for å bestemme tilstedeværelsen av et ion i en vandig prøve. Oppfinnelsen tilveiebringer en hurtig, lettvint måte for å analysere slike ioner hvorved resultatene er tilgjengelige for den som utfører analysen øyeblikkelig etter kun å ha bragt en prøveopløsning i kontakt med prøveenhetsen eller innretningen. Det er ikke noe behov for tungvint, kostbart elektronisk utstyr slik som ionespesifikke elektroder, flammefotometre, atomabsorpsjonsspektrofotometere eller liknende. Det er heller ikke nødvendig å bruke tidkrevende våtkjemi-teknikker, slik som titrering og andre laboratoriefremgangsmåter. Foreliggende oppfinnelse gjør det mulig for den som utfører analysen å bringe prøven i kontakt med en strimmelinnretning eller liknende prøveenhetutforming, og observere eventuell fargeendring.

Bestemmelsen av vandig ione konsentrasjon har anvendelse innen en rekke teknologier. I vannrensningsteknikken må kalsiumkonsentrasjon overvåkes nøye for å fastsette metningsgraden for en ionebytterharpiks som avioniseringsmiddel. Måling av natrium og andre ioner i sjøvann er viktig ved fremstillingen av drikkevann ombord på et skip til havs. Måling av kalium-nivået i blod, hjelper legen ved diagnose av tilstander som fører til muskel-irritabilitet og stimulerende endringer i hjertemuskel-funksjon. Slike tilstander omfatter oliguria, anuria, urinveisblokkering og nyresvikt på grunn av sjokk.

En hurtig, lettvint fremgangsmåte for å bestemme ione konsentrasjonen vil selvsagt i stor grad heve nivået innen disse teknologiene, så vel som innen hvilket som helst andre hvor slike hurtige, nøyaktige bestemmelser vil være fordelaktige. Dersom således f.eks. en medisinsk laboratorietekniker kunne måle kalium- eller kalsiumnivået nøyaktig i en serum- eller helblodprøve i løpet av sekunder eller

minutter, ville slike hurtige resultater hjelpe legen ikke bare i diagnostiseringen, men laboratorie-effektiviteten ville øke mange ganger.

5

Før foreliggende inkluderte framgangsmåter for bestemmelse av ioner i oppløsning flammefotometri, atomabsorpsjonsfotometri og ione-spesifikke elektroder. Bruken av disse forbindelser og blandinger som selektivt isolerer bestemte ioner fra prøveoppløsningen, er blitt populær i ione-spesifikke elektroder. Disse stoffene, kjent som ionoforer, har evne til selektivt å isolere ioner fra deres motioner og derved forårsake en ladningsadskillelse og en tilsvarende endring i elektrisk ledningsevne i fasen som inneholder ionoforen. Eksempler på ioner/ionoforfenomenet omfatter ioneanalyser under anvendelse av membranelektroder, væske/væsker-delning og fluorescens.

15

Ione-spesifikke elektroder

20

Når to oppløsninger med forskjellige konsentrasjoner av ioner adskilles ved hjelp av en elektrisk ledende membran, genereres det et elektrisk potensial (EMF). EMF utviklet ved et slikt system er en funksjon av konsentrasjon eller ioneaktivitet. Dette fenomenet uttrykkes matematisk ved hjelp av den velkjente Nernst-likning,

25

$$\varepsilon = \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_1 c_1}{\gamma_2 c_2} \quad (1)$$

30

hvor ε er EMF i det bestemte systemet, F er Faraday-konstanten ($23.062.4 \pm 0.003$ kalorier (volt ekvivalenter) $^{-1}$), R er gass-konstanten, T er temperaturen $^{\circ}\text{C}$ og γ og c er henholdsvis aktivitetskoeffisientene og de molale konsentrasjonene av ionet som undersøkes, indeksen 1 betegner oppløsningen på den ene siden av membranen, indeksen 2 betegner oppløsningen på den andre siden og n er antallet elektroner

35

som overføres i reaksjonen.

I slike membransepareringsceller, kan membranen være en enkelt frittet glassplate, som lar en liten men målbar
5 grad av ionediffusjon skje fra en oppløsning til den andre. Alternativt kan det anvendes en ikke-porøs, elektrisk ikke-ledende film, slik som ved polyvinyl klorid, som er impregneret ved en ionophor. I fravær av ionophoren er filmen en isolator og ingen EMF kan måles; når den er
10 iblandet en ionophore, bindes ladede ioner til filmen og en liten, målbar strøm kan induseres. Ettersom ionophoren er selektiv i sin affinitet, og følgelig vil binde bare visse spesifikke ioner, er slike celler ioneselektive. Enhver målbar EMF skyldes alene tilstedeværelsen av disse ionene.

15 Således kan det fremstilles en celle for å bestemme kaliumioner (K^+) ved å bruke en ionophore som er spesifikk for K^+ , f.eks. valinomycin. I nærvær av kalium gir valinomycin et ledende spor gjennom en membran ved å binde og transportere K^+ , og lar følgelig en liten elektrisk strøm
20 passere. En referanse-konsentrasjon av K^+ er plassert på den ene siden av membranen og prøven på den andre. Den fremkalte EMF måles og brukes til å beregne den ukjente konsentrasjonen ut fra likning (1). Ettersom K^+ binder seg
25 til valinomycin-membranen, oppstår det ledende sporet bare for K^+ . Den eneste EMF som utvikles skyldes derfor alene K^+ -konsentrasjon-gradienten over membranen.

Den elektriske strømmen over membranen er så liten at
30 ingen signifikant mengde K^+ eller motion transporteres gjennom dem. Membranens elektriske nøytralitet opprettholdes enten ved hjelp av en omvendt strøm av hydrogenioner, eller ved hjelp av en parallell strøm av OH^- . Denne anionvirkning kan redusere elektrodens spesifisitet
35 overfor det tilsiktede ion og er en forstyrrelse som må minimaliseres.

En hovedvanskelighet ved bruken av slike ioneselektive elektroder har vært den markerte reduksjonen av nøyaktighet og respons hurtighet over tid. Videre gir små endringer i ionekonsentrasjon slike små endringer EMF at det kreves
5 fint voltmeter-utstyr.

Det er kjent at visse antibiotika, slike som valinomycin, har en virkning på tosjikts phospholipid membraner (biologiske membraner), slik at disse antibiotikaene oppløser
10 kationer i membranen i form av mobile ladete par, og derved gir en "bærer"-mekanisme hvorved kationer kan krysse det isolerende, indre hydrokarbonlag i membranen. Slike komplekser har det eneste formål å bære kompleksladningen gjennom membranen, slik at det kan bestemmes en spennings-
15 forskjell mellom oppløsningen på hver side av membranen.

Sveitsisk Patentsøknad nr. 11428/66, inngitt 9. august 1966, beskriver bruken av porøse membraner impregnert med makrocykliske derivater av amino- og oxy-syrer i ione-
20 følsomme elektroder. Materialer brukt til å danne membranen er glassfritter og andre porøse membraner. Slike elektroder sies å være effektive ved måling av ione-aktiviteter.

U.S. Patent Nr- 4.053.381, åpenbarer liknende teknologi, og
25 anvender en ionespesifikk membran som har ionemobilitet gjennom seg.

Væske/væske-delning

30 En annen kjent anvendelse av ionophorer i ionebestemmelse er ved væske/væske-delning. Ved denne fremgangsmåten oppløses en hydrofob ionophor i et organisk oppløsningsmiddel som ikke er blandbart med vann.

35 Eisenman et al., (J. Membrane Biol. 1:294-345 (1969)) beskriver den selektive ekstraksjon av kationer fra vandige oppløsninger over i organiske oppløsningsmidler via

macrotetralid actin antibiotika. Denne teknikken omfatter utelukkende å ryste en organisk oppløsningsmiddelfase som inneholder antibiotikaene, med vandige oppløsninger som
5 inneholder kationsalter av lipid-oppløselige fargede anioner, slik som picrater og dinitrophenolater. Den organiske fasens fargestyrke måles så spektrofotometrisk for å indikere hvor mye salt som er blitt ekstrahert. Ved faseoverføring er også blitt undersøkt av
10 Dix et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17:857 (1978) og i oversiktsartikler inkludert Burgermeister et al., Top. Curr. Chem. 69:91 (1977), Yu et al., "Membrane Active Complexones", Elsevier, Amsterdam (1974) og
15 Duncan, "Calcium in Biological Systems", Cambridge University Press (1976).

Sumiyoshi. et al., Talanta, 24, 763-765 (1977) beskriver en fremgangsmåte som kan anvendes til å bestemme K^+ i
20 serum. Ved denne teknikken avproteiniseres serum ved hjelp av trikloreddiksyre, det tilsettes et indikatorfargestoff og rystes med et oppløsningsmiddel slik som kloroform som inneholder valinomycin.

25 Fordeling av en forbindelse er hurtig og effektive mellom væsker, slik som vist av Eisenman, på grunn av mobiliteten til ionophore-bæreren og ionene som lar de transporterte artene diffundere hurtig bort fra overflaten. En slik mekanisme er vanligvis umulig i den faste fasen på grunn av
30 rigiditeten, immobiliteten og hovedsakelig ingen diffusjon av materialer i en fast fase.

Fluoriserende anioner

35 Ved nok en anvendelse av målingen av ioneaktiviteten i vandige oppløsninger benyttes fluoriserende anioner.

- Feinstein, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2037-2041 (1971). Det fastslås av tilstedeværelsen av kation/ionophore-komplekser i organiske oppløsningsmidler er kjent, men at kompleksdannelse i rene vandige media inntil da ikke var blitt påvist. Feinstein et al. demonstrerte tilstedeværelsen av slike komplekser i vann ved bruken av de fluoriserende saltene 1-anilino-8-naphtahalen sulfonat og 2-p-toluidinyl sulfonatet.
- 10 Det ble funnet at gjensidig påvirkning mellom ionophore/kation kompleksene og de fluoriserende fargestoffene ga forbedret fluoressens-utstråling, økt levetid og polarisering, og betydelig skifting til blått ved de maksimale verdiene for utstråling i fluoressens-spektret. Ved konstante konsentrasjoner av ionophore og fluorophore, ble styrken på fluoressense-utstråling funnet å være en funksjon av kationkonsentrasjon.

Kromophore-merket ionophore

20

- Det beskrives en ioneanalyse i US Patent nr. 4.367.072 som gjør bruk av et konjugat av en ionophore kovalent bundet til et kromophore-materiale. Ved bruk tilsettes konjugatet til en væskeprøve og tilsynekomsten av farge i oppløsningen overvåkes spektrofotometrisk.

25

- Beskrivelsen er begrenset til en analyse i oppløsning, og det synes som om utilstrekkelig farge utvikles til å muliggjøre direkte visuell observasjon. Videre fastsettes det støkiometriske forholdet mellom kromophore og ionophore i et slikt system av en direkte binding mellom disse molekylerne. På grunn av denne direkte binding er det umulig å regulere fargestyrke; forholdet mellom ionophore og kromophore er fastlåst.

35

Oppsummering

For å oppsummere bakgrunnen av teknologiske utviklinger

som fører fram til den foreliggende oppfinnelse, så er det kjent mange fremgangsmåter for å analysere ioner i oppløsning. Instrumentelle fremgangsmåter omfatter slike forfinede teknikker som ionespesifikke potentiometri, flammefotometri og atomabsorpsjonsfotometri. Bruken av ionophorer som selektivt danner kompleks med selektive ioner, har ført til fire grunnleggende anvendelser: Ioneselektive elektroder, væske/væske-deling, fluoressens forsterkning, og kromophore-merkede ionophore konjugater.

Ingen av disse anvendelsene forsyner imidlertid den som utfører analysene med enkle, hurtige analyseresultater, ved å bringe en prøveoppløsning i kontakt med en prøve-enhet eller -innretning. Foreliggende oppfinnelse tillater på den annen side den som utfører analysene kun å bringe prøven i kontakt med en dypp-og-avles prøvestrimmel eller -innretning av liknende utforming, og observere endring i farge eller annen påvisbar respons. Videre kan graden av slik respons reguleres ved å variere støkiometrien til reaktantene som gir den.

Virkningsdata som viser dose/respons-målinger ved forskjellige utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, er tegnet opp grafisk i figurene I-VIII. Eksempelene hvor dataene ble frembragt, er beskrevet i eksemplene nedenunder.

Oppfinnelsen vedrører en prøveenhet for å bestemme tilstedeværelsen av et ion i en vandig prøve, idet prøveenheten er karakterisert ved at den omfatter en hydrofil bærergrunnmasse inkorporert med finfordelte dråper av et hydrofobt hjelpemiddel, idet hjelpemidlet inneholder

- en ionofor som er i stand til å danne et kompleks med ionet, og
- en indikator som er i stand til ved gjensidig påvirkning med kompleks av ionofor og ion å gi en påvisbar respons, idet det hydrofobe hjelpemiddel har følgende egenskaper:
 - i) har tilstrekkelig hydrofobisitet til å isolere ionoforen og indikatoren fra den vandige prøve,

- ii) slippe bare gjennom ioner som reagerer med ionoforen,
- iii) løser opp ionoforen og indikatoren,
- iv) er uoppløselig i vann,
- v) er ikke flyktig.

5 En prøveinnretning hvor prøveenheten er innlemmet omfatter en avlang bærerdel, slik som et plastfilm, hvor prøveenheten er festet til en flat side.

10 Ved bruk bringes prøven i kontakt med prøveenheten eller -innretningen. Tilstedeværelsen og/eller konsentrasjonen av ionet bestemmes ved å observere eventuell påvisbar respons som fremkommer.

15 Prøveenheten og -innretningen ifølge foreliggende oppfinnelse gir hurtige resultater idet tilstrekkelig påvisbar respons dannes i det minste i løpet av noen få minutter i de fleste tilfeller. Det kreves ikke noe tungvint, kostbart prøveutstyr i tillegg til foreliggende oppfinnelsen; responsen kan være av tilstrekkelig
20 størrelse til å muliggjøre direkte visuell påvisning. Videre er det funnet at fargen eller annen respons som frembringes i prøveenheten, er stabil, i noen tilfeller i en periode på dager, slik at et antall brukte prøveenheter kan settes til side for avlesning en eller annen gang i
25 fremtiden.

Visse uttrykk som brukes i foreliggende beskrivelse skal nevnes på dette punkt for å sikre at leseren har den
30 samme oppfatning med hensyn til deres respektive betydninger om forfatteren. De følgende definisjoner gis følgelig for å klargjøre omfanget av foreliggende oppfinnelse og for å muliggjøre dens utforming og bruk.

35 Uttrykket "ionophore" omfatter molekyler som er i stand til å danne et kompleks med et bestemt ion, i noen tilfeller under hovedsakelig uttrykkelse av andre. F.eks. bindes det cykliske polypeptidet, valinomycinet, selektivt

til kaliumioner i oppløsning hvorved det dannes et kationisk kompleks. Inkludert i uttrykket er også korronander, kryptander og podander.

5 En indikator er en som er i stand til ved gjensidig påvirkning med et ionophore/ion kompleks å gi en farge-
endring eller annen påvisbar respons. Indikatoren
kan således være et ionisk fargestoff, slik at når
10 fargestoffet er i sin ioniserte tilstand, er det et mot-
ion, dvs. har motsatt ladning av ionet som skal analyseres.
Noen eksempler på disse er erythrosin B, 7-amino-4-
trifluorometyl coumarin og natriumsaltet av 2,6-dikloro-
indofenol. Indikatoren omfatter også fenolforbindelser,
15 slik som p-nitrofenol, som er forholdsvis fargeløst i den
ikke-ioniserte tilstand, men som farges etter ionisering.
Rapportørstoffet kan også være et som kan uttløse en
påvisbar respons sammen med andre forbindelser. F.eks.
kan jodidionet gi en påvisbar respons ved gjensidig påvirkning
20 med ionophore/ion komplekset i nærvær av stivelse og et
oksydasjonsmiddel.

Ved "gjensidig påvirkning" er ment ethvert samvirke mellom
en indikator og et ionophore/ionkompleks som fører
25 til en påvisbar respons. Et eksempel på at rapportør-
stoffet gir gjensidig påvirkning med komplekset, er i
tilfellet hvor indikatoren endres av komplekset fra
fargeløs til en farget tilstand, slik som i tilfellet
med p-nitrofenol.

30 Uttrykket "påvisbar respons" er her ment som en endring
i eller fremkomst av en parameter i et prøveenhetsystem
som er i stand til å bli registrert, enten ved direkte
oksydasjon eller instrumentelt, og som er en funksjon av
tilstedeværelse av et bestemt ion, i en vandig prøve.
35 Noen påvisbare responser er endringen i eller fremkomsten
av farge, fluoressens, refleksjonsfaktor, pH, kjemilumin-

issens og infrarøde spektra.

Ved uttrykket "middelsalkyl" slik det her er brukt, er ment en alkylgruppe med fra ca. 4 til ca. 12 karbonatomer.

5 Det omfatter normale og forgrenede isomerer. Det kan være usubstituert eller det kan være substituert forutsatt at enhver slik substitusjon ikke virker inn på bruken av den her krevde prøveenhets eller -innretning når det gjelder dens evne til å påvise ioner.

10

Uttrykket "laverealkyl", slik er det brukt i foreliggende beskrivelse, er ment som en alkylrest som inneholder ca. 1 til 4 karbonatomer. Omfattet innenfor betydningen laverealkyl er metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, 15 sec-butyl og tert-butyl. Disse kan være usubstituerte, eller de kan være substituerte forutsatt at eventuelle slike substituenten ikke virker inn på bruken eller virkningen av den her krevde prøveenhets eller -innretning, når det gjelder dens evne til å påvise ioner.

20

Med "pseudohalogen" er ment atomer eller grupper av atomer som, når de er bundet til et umettet eller aromatisk ring-system, påvirker de elektrophile eller nukleofile egenskapene til ringsystemet, og/eller har en evne til å innfluere på 25 fordelingen av en elektrisk ladning ved delokalisering eller ressonans på en måte som svarer til halogenenes. Mens halogen betegner kationer i gruppe VII som som F, Cl, Br og I, omfatter således pseudohalogener slike rester som CN, -SCN, -OCN, -N₃, -COR, -COOR, -CONHR, -CF₃, -CCl₃, 30 -NO₂, -SO₂CF₃, -SO₂CH₃ og -SO₂C₆H₄CH₃, hvor R er alkyl eller aryl.

Uttrykket "dråpe" slik det her er brukt henviser til typen sfæriske eller kvasi-sfæriske småkuler, eller klumper eller 35 andre formede partikler av et stoff slik som dannes i tofasede suspensjoner eller emulsjoner. Når en olje-i-vann

suspensjon eller emulsjon dannes, foreligger således den hydrofobe oljefasen som kuleformede enheter omgitt av en mer eller mindre kontinuerlig vandig fase. Dess mer energi som tilføres ved dannelsen av suspensjonen, dess
5 mindre blir størrelsen på dråpene. Likeledes kan dråpe-
størrelsen kontrolleres ved hjelp av tilsetningsstoffer
slik som detergenter og andre emulgeringsmidler.

10 Inkludert i betydningen for uttrykket "dråpe" er også
finfordelte partikler av et fast materiale. Når det
hydrofobe hjelpemidlet er et ikke-porøst, ikke-polart
materiale, slik som en polymer, kan det således males eller
på annen måte finfordeles i faste partikler.

15 Ved "hydrofil" er ment den egenskapen hos et stoff at det
har en sterk eller uttalt tendens til å binde eller absorbere
vann. Inkludert i uttrykket er de materialene som gjennom-
går svelling eller dannelsen av reversible geler med vann,
eller som er fuktbare eller gjennomtrengelige med vann,
20 eller som danner vandige oppløsninger.

Den foreliggende prøveenhets omfatter fire grunndeler:
En hydrofil bærerbrunnmasse; finfordelte dråper av et
hydrofobt hjelpemiddel, en ionophore iblandet dråpene
25 og et rapportørstoff som også foreligger i dråpene. Når
en vandigprøve inneholder et ion som er i stand til å
danne kompleks med ionophoren, kan ionet komme inn i de
hydrofobe dråpene og gi gjensidig påvirkning med rapportør-
stoffet, og derved produsere en påvisbar respons.

30

Bærer-grunnmassen

For at prøveenhets skal kunne gi en påvisbar respons på
et bestemt ion, er det nødvendig at den vandige prøven
35 har i det vesentlige uhindret tilgjengelighet til den
ytte overflaten av de hydrofobe dråpene. Bærergrunn-
massen som dråpene er innlemmet i, må følgelig være lett

fuktbar med vandige systemer, dvs. være hydrofil.

5 Typiske eksempler på materialer som utviser egnede hydrofile egenskaper er gelatin, agarose, polyvinyl-alkohol, polypropylenimin, karrageenan og alginsyre. Disse er vannoppløselige polymerer som i sin tørre tilstand oppviser en markert evne til å fuktes av vandige medier.

10 Andre, uoppløselige polymere materialer som er egnet for bruk, omfatter porøse stoffer, slik som papir og andre cellulose-systemer, sintrete keramiske fritter og liknende porøse, hydrofile grunnmasser, forutsatt at dråpene kan opprettholdes uskadd. En egnet bærer-
15 grunnmasse er således f.eks. en kombinasjon av papir og gelatin. I dette tilfellet kan en pute av filterpapir være impregnert med en stabil emulsjon av vandig gelatin og de hydrofobe dråpene. Etter tørking er filterpapir/gelatin-bæregrunnmassen i stand til å bevare dråpene
20 uskadd inntil prøveenheden tas i bruk.

Det hydrofobe hjelpemidlet

Den primære funksjonen til det hydrofobe hjelpemidlet ifølge oppfinnelsen er å isolere ionophoren og rapportør-
25 stoffet fra den vandige prøven. Hjelpemidlet kan følgelig være en væske eller et fast stoff, bare det har tilstrekkelig hydrofobisitet til å gi den ovenfor nevnte isolering av reagensene fra prøven. Videre må hjelpemidlet utelukke
30 vesentlig ionisk gjennomtrenging av dråpene, med mindre ionet er et som er i stand til å danne kompleks med ionophoren.

35 Stoffer som kan anvendes som hydrofobe hjelpemidler omfatter væsker som på samme tid er uoppløselig i vann og er i stand til å oppløse en ionophore og et rapportørstoff, i tilstrekkelig konsentrasjon til å gi en vesentlig respons når de brukes. De må være forholdsvis ikke-

flyktige, dvs. ha et kokepunkt på minst ca. 150°C. Typiske væsker som faller innenfor denne kategorien er trikresylfosfat, 2-nitrofenyloktyl eter, 2-nitrofenyl-butyl eter, dioktylphthalat, tris-2-etylheksylfosfat, do-2-etylheksylsebakat og n-butyl acetyl ricinolat.

I tillegg til oljer og andre flytende hjelpemidler, er det likeledes mulig å utnytte finfordelte partikler (småkuler) av faste materialer, for å oppbevare og isolere ionophoren og rapportørstoffet. Hjelpemidlet kan således omfatte hydrofobe materialer slik som organiske polymerer som er i det vesentlige ikke-porøse og ikke-polare. Disse omfatter polyvinyl fluorid, polyvinyl klorid, vinyl klorid/vinyl acetat-copolymer, vinyl klorid/vinylidene klorid-kopolymer, vinyl klorid/vinyl acetat/vinyl alkohol-terpolymer, vinyliden klorid/acrylonitril-kopolymer, og polyurethan. Mange andre polymere materialer ville selvfølgelig væreegnet for bruk som det hydrofobe hjelpemiddel og identifiseringen av slike materialer ligger godt innenfor ferdighetene innen teknikken når man har den foreliggende beskrivelse.

Ionophorer

Ionophordelen av foreliggende oppfinnelse er et begrep som virkelig har et stort omfang, slik den er kjennetegnet ved definisjonen av uttrykket ovenfor. Den omfatter flertannede ringformede forbindelser som inneholder donor atomer i sine cykliske kjeder. Slike flertannede ringformede forbindelser kan være monocykliske eller polycykliske. Alternativt kan ionophoren være en åpen kjede som inneholder donor atomer. Inkludert i ionophoredelen er således monocykliske systemer, som er ionespesifikke, kalt koronander, polycykliske ionespesifikke forbindelser kjent som kryptander; og åpne kjedestrukturer, som er kjent som podander, og som er i stand til selektivt å danne kompleks med ioner.

Koronander

Koronandene er monocykliske forbindelser som inneholder
5 donor atomer som er elektronrike eller -fattige og som er
istand til å danne kompleks med bestemte kationer og anioner
på grunn av sine enestående strukturer. Inkludert i dette
uttrykket er kroneeterne, hvor den monocykliske kjeden inne-
holder oksygen som donor atomene. Andre koronandere er
10 forbindelser som inneholder et utvalg av elektronrike atomer
slik som oksygen, svovel og nitrogen. På grunn av de
enestående størrelsene og formene til bestemte koronander
lar de seg tilpasse kompleksdannelse med forskjellige ioner
Ved slike kompleksdannelser orienterer de elektronrike
15 atomene, slik som oksygenatomene i en kroneeter, seg mot
det elektronfattige kationet. Karbonatomsegmentene i
kjeden innstilles samtidig i en retning ut fra ionet.
Følgelig er det resulterende ion/koronandekompleks ladet
i sentrum, men er hydrofobt i sin omkrets.

20

Kryptander

Kryptandene er polycykliske analogene til koronandene. De
omfatter følgelig bicykliske og tricykliske flertannede
25 forbindelser. I kryptandene er det cycliske arrangementet
av donoratomer tredimensjonalt i rommet, i motsetning til
den hovedsakelig plane konfigurasjonen til koronanden.
En kryptand er i stand til praktisk talt å innfylle ionet
i tredimensjonal form og er følgelig i stand til å danne
30 sterke bindinger til ionet under kompleksdannelsen. Som
i koronandene kan donor atomene omfatte slike atomer som
oksygen, nitrogen og svovel.

Podander

35

Ioner kan også danne komplekser med ikke-cykliske for-
bindelser. For eksempel har en rettkjede som inneholder

en regulær sekvens av elektronrike atomer, slik som oksygen, evnen til å forbinde seg med positivt ladede ioner slik at det dannes komplekser, slett ikke ulikt koronandene og kryptandene. Den hovedsakelige strukturelle forskjellen mellom podander og de andre to ionophorene er åpenheten i strukturen. Podander kan således være oppdelt i monopodander, dipodander, tripodander etc. En monopodander er derfor en enkel organisk kjede som inneholder donor atomer, en dipodand er to slike kjeder, koblet sammen ved hjelp av et bruatom eller en gruppe av atomer som er i stand til å gi forskjellig romslig orientering, tripodand er tre kjeder, festet til et sentralt atom eller gruppe av atomer.

15 Spesifikke ionophorer

Noen av ionophorene som er funnet å være særlig nyttige ved foreliggende oppfinnelse, er oppstilt i tabellen nedenunder sammen med de kationene som de er i stand til selektivt å danne kompleks med.

Ionophore	Kation
Valinomycin	K^+
25 4,7,13,16,21-pentaoxa-1,10-diaza-bicyklo(8,8,5)tricosan ("kryptofix 221")	Na^+
4,7,13,16,21,24-heksaoxa-1,10-diaza-bicyklo(8,8,8)heksacosan ("kryptofix 222")	K^+
30 4,7,13,18-tetraoxa-1,10-diaza-bicyklo(8,5,5)eicosane ("kryptofix 211")	Li^+
12-krone-4	Li^+
35 16-krone-5	Na^+, K^+
18-krone-6	K^+
Dibenzo-18-krone-6	K^+
Dicykloheksano-18-krone-6	K^+

Indikatoren

5 Når ionet av interesse er tilstede i prøveoppløsningen er det indikatoren som gir den påvisbare respons ved gjensidig påvirkning med ionophore/ion-komplekset. Rapportørstoffet kan variere i sammensetning fra en enkel forbindelse, slik som en kromogen motioniserbar forbindelse til en blanding av reaktive arter som gir et påvisbart produkt når deres reaksjonsskjede utløses ved nærværet av 10 komplekset. Det kan således sees at når det ikke er noe analyttion tilstede, forblir indikatoren uvirksom; ingen påvisbar respons observeres. Når derimot det bestemte ionet som overvåkes, er tilstede, gir komplekset gjensidig 15 påvirkning med transportørstoffet og induserer det til å gjennomgå en påvisbar endring.

I det tilfellet hvor indikatoren er en enkelt forbindelse, kan det omfatte en dissosierbar forbindelse, slik at etter 20 dissosiering, dannes det en farget ioneart. Et ionisk rapportørstoff velges vanligvis slik at det fargede ionet har motsatt ladning av analytten. En dissosierbar forbindelse hvor motonet til analytten er fluoriserende, er også nyttig. Eksempler på slike kromophore og fluorophore 25 rapportørstoffer er diklorfenolindofenol, fluorescein og deres derivater, 8-anilinio-1-naftalensulfonsyre, 7-amino-4-trifluormetyl coumarin, erythrosin B, orange IV, phloxin B og eosin Y. Strukturene til erythrosin B, phloxine B og eosin Y er angitt i "Aldrich Handbook of 30 Fine Chemicals", Aldrich Chemical Company, Milwaukee (1983). Strukturen til orange IV kan finnes i "The Merck Index", 9th ed., Merck & Co., Inc. Rahway (1976).

35 Når indikatoren omfatter en blanding av reaktive arter, er stor handlefrihet mulig ved utvelgelse av en passende kombinasjon av bestanddeler. F.eks. kan et system være iodidion, stivelse og et oksydasjonsmiddel. Et slikt system

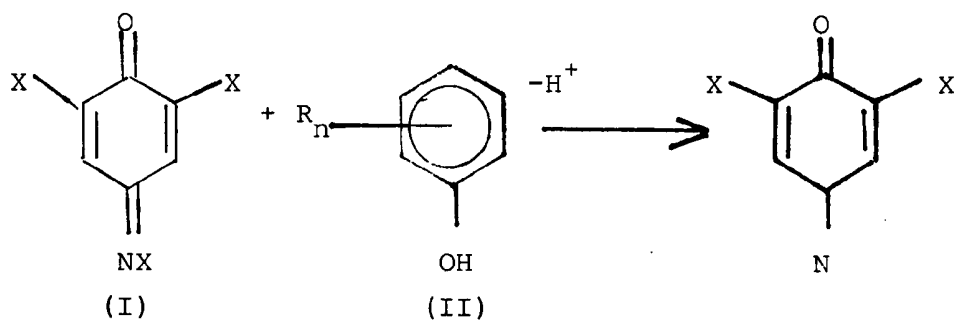
kan anvendes i en prøveenhets hvor det hydrophobe hjelpe-
midlet inneholder (i tillegg til ionophore) stivelse og
oksydasjonsmidlet. Jodid kan så tilsettes til prøven.

5 I nærvær av et analyttion vil dannelsen av ion/ionophore-
komplekset få jodid til å forbinde seg med grunnmassen
hvoretter det vil omdannes til fritt jod, og således angi
en positiv prøve.

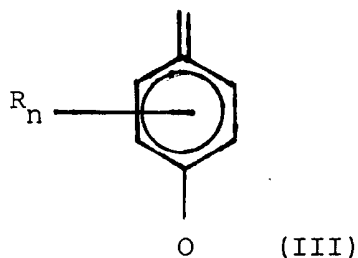
10 Nok et annet eksempel på en reaksjonsrekkefølge som kan
anvendes som indikator, er en som omfatter dis-
sosieringen av et proton fra en fenol, og således
initiere en sammenkoblingsreaksjon slik at det dannes et
farget produkt. Typisk for en slik reaksjonsrekke-
15 følge er den såkalte Gibbs Reaksjon hvor 1,2,5-cyklo-
heksadien-1-one-2,6-dihalo-4-haloimin (I) bindes til en
fenol (II) hvorved det dannes et farget reaksjons-
produkt (III).

20

25



30



35

Ved denne reaksjonsrekkefølgen kan R være hvilket som helst substituent i 2,3,5 og/eller 6-stilling som ikke hindrer den totale reaksjonsrekkefølgen. Således er R lavere eller middels alkyl eller aryl, eller R kan danne et kondensert ringsystem enten i 2,3- eller 5,6-stillingene. X er et halogen eller pseudohalogen, og n er 0-4. Denne typen rapportørstoff anvendes ved å innlemme forbindelser med strukturformlene (I) og (II) i det hydrophoberte middel.

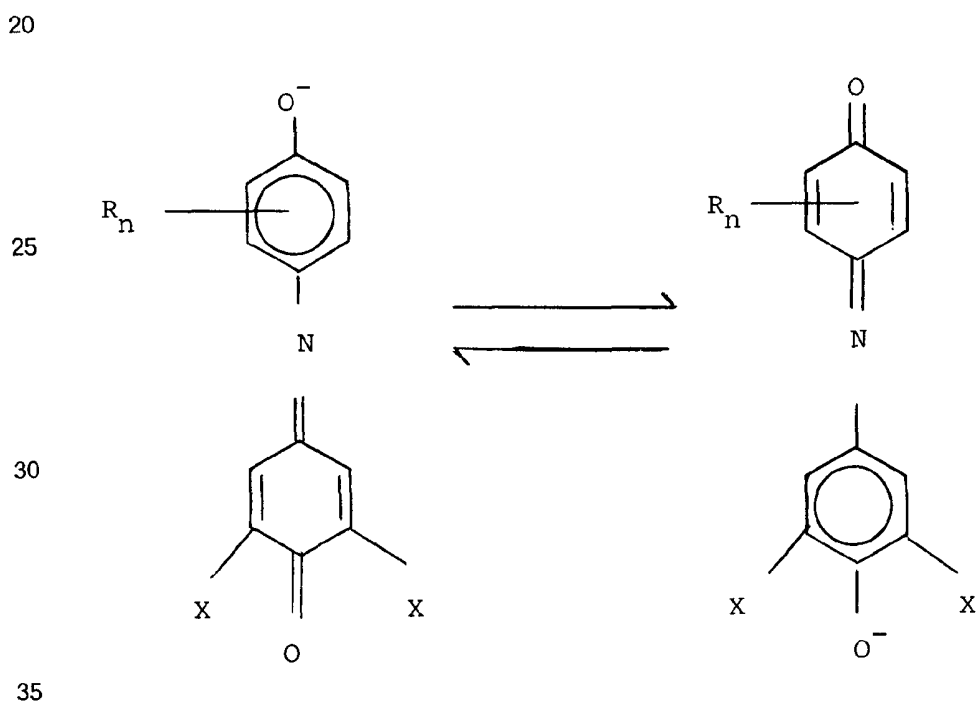
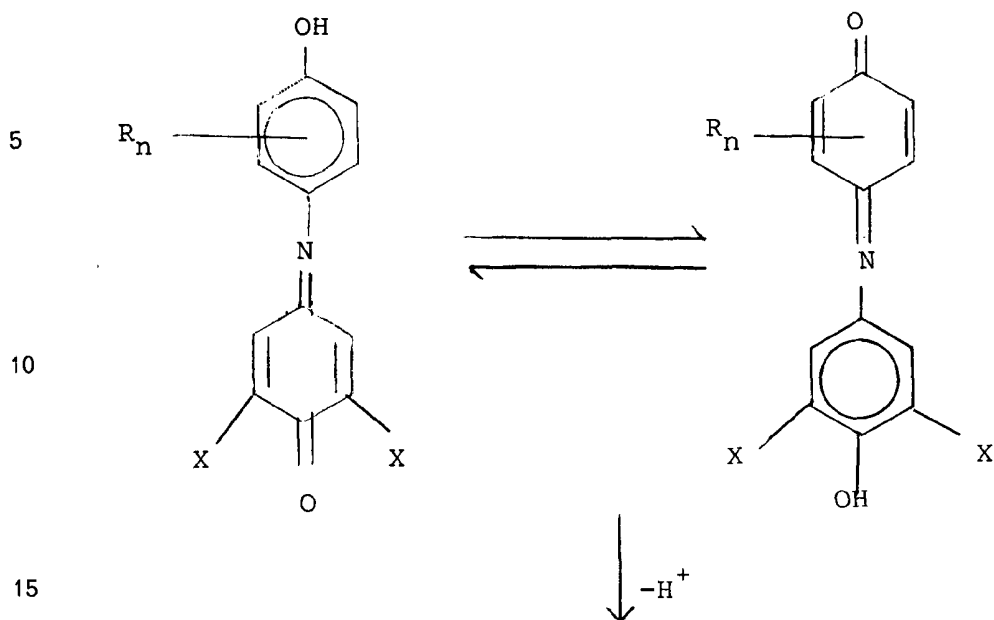
Nok en annen anvendelse av Gibbs-kjemien omfatter forbindelser med en struktur slik som (III) i sin ikke-ionisert form. Dannelsen av ion/ionophore komplekset resulteter i en gjensidig påvirkning slik at rapportørstoffet (III) gir observerbar farge i og av seg selv. Dette fenomenet kan betraktes som forløpende i henhold til den følgende reaksjonsrekkefølge og med ressonans-strukturene

20

25

30

35

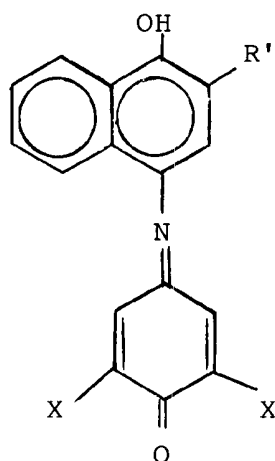


hvor R, som er den samme eller forskjellig, er laver
eller middels alkyl, aryl, eller et kondensert ringsystem.
I 2,3- eller 5,6-stillingene, og n er 0-4. Særlig fore-
trukket er en forbindelse med strukturen

5

10

15



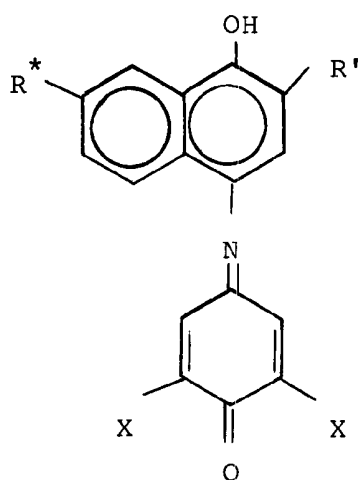
hvor R' er H eller laverealkyl. Tilfellet hvor R' er
metyl er funnet særlig egnet for foreliggende oppfinnelse.

20

Nok et annet foretrukket indikator er en forbindelse
med strukturen

25

30



hvor R* er middels alkyl, dvs. en gruppe med 4-12 karbon-
atomer, og hvor R' er som definert ovenfor. Slike forbindelser

som disse er funnet å være særlig motstandsdyktige mot mulig forstyrrelse på grunn av tilstedeværelse av serum-albumin i prøven. Foretrukket blandt disse typene
5 rapportørstoffer er den hvor R* er n-decyl og R' er metyl.

Prøveinnretningen

10 Prøveenheten beskrevet ovenfor kan være montert på den ene enden av en avlang bærerdel, idet den andre enden av bæreren tjener som et håndtak. En slik prøveinnretning kan holdes i håndtakenden mens den andre enden som bærer
15 prøveenheden bringes i kontakt med prøven.

Materialer som kan anvendes til bærerdelen, omfatter filmer av en lang rekke plaster eller polymerer. Eksempler omfatter slike polymere materialer som celluloseacetat, polyetylen terephthalat, polykarbonater og polystyren.

20 Bæreren kan være opaque eller den kan slippe lys eller annen energi gjennom. Foretrukkede bærere omfatter gjennomskinnelige materialer som er i stand til å slippe gjennom elektromagnetisk stråling med en bølgelengde i området fra ca. 200 nanometer (nm) til 900 nm. Bæreren behøver selv-
25 følgelig ikke å slippe gjennom hele området fra 200-900 nm selv om det for fluorometrisk påvisning av analytiske resultater er nødvendig at bæreren er gjennomskinnelig over et bånd som er videre enn eller i det minste lik med absorpsjons- og emisjonsspektraene til de fluoriserende
30 materialene som brukes til påvisningen. Det kan også være ønskelig å ha en bærer som slipper gjennom et eller flere trange bølgelengdebånd og som er opaque overfor tilgrensende bølgelengdebånd. Dette kan oppnås f.eks. ved å impregnere eller belegge bæreren med et eller flere fargestoffer som
35 har egnede absorpsjonskarakteristika.

For å fremstille en prøveinnretning ifølge foreliggende

oppfinnelse festes et lite rektangel av prøveenheden, dvs. en hydrofil bærergrunnmasse, iblandet dråper av et hydrofobt hjelpemiddel som inneholder en ionophore, et rapportørstoff og eventuelt andre bestanddeler, til en
5 avlang bærerdell med en øvre i det vesentlige plan overflate, slik som et avlangt stykke polystyrenfilm. Prøveenhetsstykket festes til den plane overflaten i en ende, idet den andre enden av polystyrenet får tjene som et bekvemt håndtak.

10

Prøveenheden kan være festet ved hjelp av hvilket som helst middel som er forenlig med den påtenkte bruken. En fremgangsmåte er å bruke en dobbeltsidig tape mellom prøveenhetskvadratet og bærerdelen. En slik tape er kjent som Double
15 Stick[®]. En annen måte å feste prøveenheden på er å støpe en film av en emulsjon av en vandig polymer fase (dvs. en hydrofil bærergrunnmasse) og et hydrofobt hjelpemiddel som inneholder ionophoren og rapportørstoffet direkte på bæreren etterfulgt av et tørkettrinn.

20

Anvendelse av oppfinnelsen

Prøveenheden og -innretningen ifølge foreliggende oppfinnelse kan tilpasses for bruk ved utførelse av en lang rekke kjemiske
25 analyser, ikke bare innen området klinisk kjemi, men i kjemisk forskning og i kjemiske prosesskontrollaboratorier. De er vel egnet for bruk i klinisk analyse av kroppsvæsker, slik som blod, blodserum og urin, ettersom det i dette arbeidet ofte utføres en lang rekke gjentatte prøver,
30 og prøveresultatet trengs ofte en svært kort tid etter at prøven er tatt. F.eks. på blodanalyseområdet kan oppfinnelsen tilpasses for bruk ved utførelse av kvantitative analyser på mange av de ioniske blodbestanddelene av kliniske interesser.

35

Prøveenheden (og -innretningen) brukes ved å bringe den i kontakt med prøven i en tilstrekkelig lang tidsperiode

(slik som flere minutter). Deretter kan overskuddsprøve fjernes, slik som ved vasking i en slags vannstrøm med derpå følgende fjerning med silkepapir, eller ved kun
5 å tørke det av. Det kan eventuelt være unødvendig å fjerne prøven.

Dersom ionet som analyseres er tilstede i prøven, vil komplekset av ionophore og ion gi gjensidig påvirkning
10 med rapportørstoffet og en påvisbar respons vil oppstå. Når rapportørstoffet er et dissosierbart stoff som gir et farget motion til analytten, vil det dannes en observerbar farge i enheten med bærergrunnmassen. Når rapportørstoffet er en fluorophore slik som fluorescein, kan det anvendes
15 et fluoressens spektrofotometer for å måle den påvisbare responsen som dannes i prøveenheten (her fremkomsten av eller endringen i fluoressens). Andre teknikker som kan anvendes ved observasjon av en påvisbar respons, omfatter reflektans spektrofotometri, absorpsjons spektrofotometri,
20 og lystransmisjonsmålinger.

Når prøven er blodserum, kan det brukes transmisjons-teknikker for å påvise og kvantifisere tilstedeværelsen av eventuelt reaksjonsprodukt, hvis dannelse tjener som
25 den påvisbare respons. I dette tilfellet rettes strålingsenergi, slik som ultrafiolett, synlig eller infrarød stråling, mot en overflate av prøveenheten, og utsendelsen av den energien fra den motsatte overflaten måles. Generelt er elektromagnetisk stråling i området fra ca. 200 til ca.
30 900 nm funnet å være anvendelig for slike målinger, selv om enhver stråling som trenger gjennom prøveenheten og som er i stand til å betegne fremkomsten eller utstrekningen av responsen, kan brukes.

35 Forskjellige kalibreringsteknikker kan anvendes som en kontroll på analysene. F.eks. kan det anvendes en prøve av

analytt standardoppløsning på en separat prøveenhets som en sammenlikning eller for å muliggjøre bruken av differensialmålinger i analysen.

5

De følgende eksempler er gitt for ytterligere å hjelpe leseren ved fremstillingen og bruken av foreliggende oppfinnelse. Således er beskrevet foretrukket utførelsesformer i eksperimentell detalj og resultatene er analysert.

10 Eksempelene er ment kun å være illustrerende og er ikke på noen måte ment som begrensende for omfanget av den beskrevne og krevde oppfinnelsen.

Eksempel 1:

15

Fremstilling av 7-(n-decyl)-2-metyl-4-(3',5'-diklorophen-4'-one)indonaphthol.

Tittelforbindelsen (heretter 7-decyl-MEDPIN) ble fremstilt
20 for bruk som en indikator i foreliggende prøveenhets og prøveinnretning. Reaksjonsrekkefølgen er tegnet opp i det følgende skjema hvor R* er n-decyl.

25

30

35

5

10

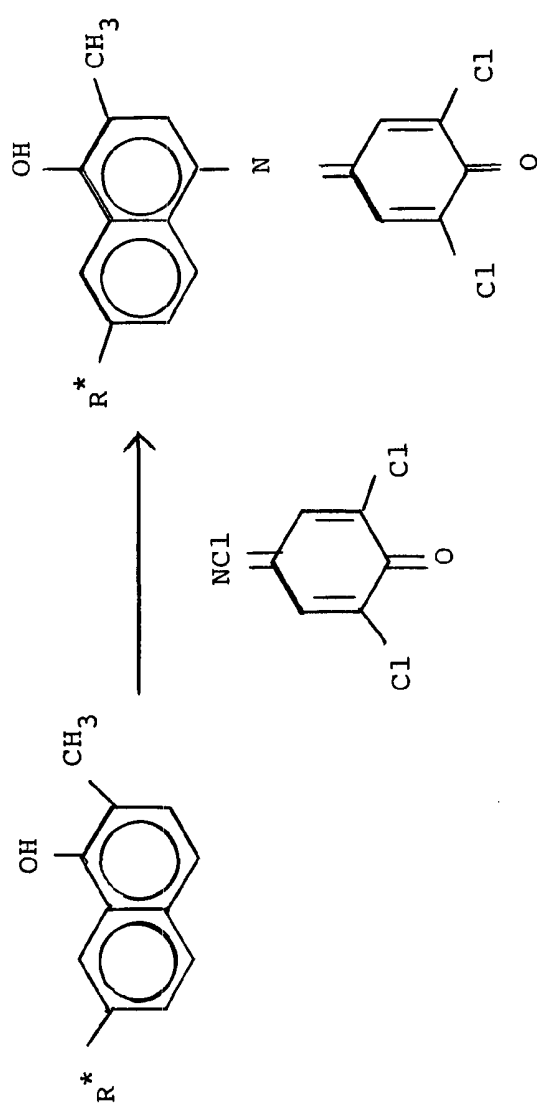
15

20

25

30

35



Fremstilling av β -(p-n-decylbenzoyl)-propionsyre.

En blanding av 26,2 g fenyl decan (1,2 mol), 120 g
ravsyreanhydrid (1,2 mol) og 360 ml nitroetan i en 5 l
5 trehalset kolbe utstyrt med HCl utløp og mekanisk omrører
ble avkjølt til 0°C i et isbad. Til denne blandingen
ble 360 g AlCl₃ (2,7 mol) tilsatt sakte i løpet av en
halv time med omrøring. Utvikling av HCl ble observert
når ca. halvparten av AlCl₃ var tilsatt. Etter tilsetningen
10 ble isbadet fjernet og reaksjonsblandingen fikk stå ved
værelsestemperatur (RT) i 5 minutter. Blandingen ble så
oppvarmet over et dampbad. Oppvarmingen og omrøringen ble
fortsatt inntil den kraftige utviklingen av HCl opphørte
(ca. 30 minutter). Reaksjonsblandingen ble avkjølt i et
15 isbad mens 2 l isvann ble tilsatt etterfulgt av 600 ml
konsentrert HCl. Dette ble omrørt ved værelsestemperatur
i 2 timer inntil alt mørkebrunt faststoff var hydrolysert.
Det uoppløselige produktet ble utvunnet ved filtrering.
Det faste stoffet ble så rekrystallisert to ganger med
20 eddiksyre (250 ml hver gang) hvorved man fikk ca. 320 g
(85% utbytte) av produktet (tørket under vakuum over
KOH).
TLC: RF = 0,43 i 1:1 (v/v) EtOAc:toluen (siliciumdioksyd-
gel-plate).

25
Analyse: Beregnet for C₂₀H₃₀O₃: C: 75, 42
H: 9, 50
Funnet C: 76, 02
H: 9, 89.

30

Fremstilling av 4-(p-n-decyl-fenyl)-smørsyre

20 g Pd/C (palladium-mettet karbon) og β -(p-n-decyl-
benzoyl)-propionsyre (150 g 0,47 mol) ble blandet med
35 eddiksyre (350 ml) i en 1 l. Paar-bombe. Reaksjonen ble
startet opp ved 3,5 kg/cm³ H₂ trykk og 50°C. Det ble
 observert en plutselig økning i temperatur ledsaget av et

fall i H₂ volum. Tynnsjikt-kromatografi av reaksjons-
blandingen indikerte funnstendig reaksjon. Katalysatoren
ble fjernet ved hjelp av glassfiberfiltrering i varm
5 tilstand. Filtratet fikk utkrystallisere ved værelses-
temperatur. Det krystallinske produktet ble utvunnet
ved filtrering. En andre produktmengde som ble dannet etter
at filtratet var avkjølt, ble også utvunnet. Det totale
utbyttet var 100 g (68%) etter tørking under et vakuum
10 over KOH. Smeltepunkt: 67 - 69°C.

TLC: R_f = 0,68 i 1:1 (v/v) EtOAc: toluen (siliciumdioksyd-
gel-plate)

15 Analyse: Beregnet for C₂₀H₃₂O₂: C: 8,90
H: 10,50
Funnet C: 78,39
H: 10,70.

20 Fremstilling av 7-n-decyl-1-tetralon.

En blanding av p-decyl-fenyl smørsyre (30 g, 98,7 mmol)
og polyfosforsyre (150 g) ble oppvarmet i et oljebad inntil
alt fast stoff var smeltet. Oppvarmingen ble økt til 150°C
25 (indre temperatur) og blandingen ble omrørt kraftig i
30 minutter. Reaksjonsblandingen ble så avkjølt til
værelsestemperatur og behandlet med 300 ml isvann og 150 ml
etyleter. Etter at blandingen var omrørt i 30 minutter ved
værelsestemperaturen, ble det vandige sjiktet fraseparert,
30 og vasket to ganger med 150 ml etyleter. De blandede
organiske fasene ble vasket med 150 ml mettet vandig NaCl.
Eter ble fjernet ved inndamping og resten ble destillert på
et Kügelrohr destillasjonsapparat. Produktet hadde et
kokepunkt på 190°C - 200°C/0,1 mm Hg. Utbyttet var 11 g
35 (39%) med lyse gul olje.

TLC: Rf= 0,34 i tolueen (siliciumdioksyd gel-plater).

Analyse: Beregnet for: $C_{20}H_{30}O$: C, 83.90
H, 10.70
5 Funnet C, 85,63
H, 10.83.

10 Fremstilling av 2-hydroksymetylen-7-n-decyl-1-tetralon.

En blanding av natriummetoksyd (5,4 g, 40,5 mmol), etylformiat (7,4 g, 100 mmol) og 100 ml tørr tolueen ble avkjølt i et isbad under inert atmosfære (N_2 eller argon).

15 En oppløsning av 7-decyl-1-tetralon (11.5 g, 40 mmol) i 100 ml tørr tolueen ble tilsatt ved hurtig omrøring.

Isbadet ble fjernet og reaksjonsblandingen ble omrørt ved værelsestemperatur i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble behandlet med 100 ml vann og 100 ml 6N HCl.

20 Det organiske sjiktet ble fraskilt og vasket to ganger med 50 ml mettet NaCl, tørket over vannfri Na_2SO_4 , filtrert og inndampet for å fjerne alt tolueen. Den oljeaktige resten ble brukt til den neste reaksjonen uten ytterligere rensing.

25 TLC: Rf= 0,56 i tolueen (siliciumdioksyd-gel-plater).

Flekken gikk over til mørkebrunt etter sprøyting med 5% $FeCl_3$ oppløsning.

30 Fremstilling av 2-benzoyloksymetylen-7-n-decyl-1-tetralon.

Den oljeaktige resten fra reaksjonstrinnet ovenfor ble blandet med tørr pyridin (120 ml). Oppløsningen ble omrørt under nitrogen ved $0^\circ C$ (isbad). Oppløsningen ble
35 behandlet med 30 ml benzoylchlorid. Etter tilsetningen av benzoylchloridet, ble det observert uoppløselig pyridinium klorid i blandingen. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved

værelsestemperatur i 2 timer. Produktet ble helt over i isvann (400 ml) med kraftig omrøring. Det lys kremfargede faste stoffet ble utvunnet ved filtrering, og vasket godt med kaldt vann. Det litt fuktige faste stoffet ble rekrystallisert fra varm absolutt etanol (120 ml). Hvitt fast stoff (14 g, 87% utbytte basert på 7-decyl-1-tetralon) ble utvunnet. Smeltepunktet var 64 - 66°C.

10 TLC: Rf= 0,40 i toluen (siliciumdioksyd gel-plater).

Analyse: Beregnet for: $C_{28}H_{34}O_3$: C, 80.34

H, 8.19

Funnet C, 80.05

15

H, 8.27.

Fremstilling av 7-n-decyl-2-metyl-1-naphthol.

20 Til en blanding av 2-benzoyloksymetylen-7-n-decyl-1-tetralone (14 g, 33,5 mmol) og Pd/C (3,5 g) under inert atmosfære ble tilsatt cykloheksen (175 ml). Blandingen ble oppvarmet under tilbakeløp mens den inerte atmosfæren ble opprettholdt. Omdannelsen av utgangsmaterialet til
25 produkt ble bestemt ved hjelp av TLC etter 3 timer. Etter at alt utgangsmaterialet hadde reagert, ble blandingen nedkjølt til værelsestemperatur. Katalysatoren ble fjernet ved filtrering og vasket to ganger med 50 ml varm toluen. Det blandede filtratet ble inndampet til et
30 lite volum. Produktet ble renset ved hjelp av en "Prep-500" silicium gel-kolonne (en preparativ, høytrykks-siliciumdioksyd gel-kolonne). Toluen ble brukt som den mobile fasen. Produktfraksjonene ble slått sammen og inndampet til tørrhet under vakuum over natten. Kremhvitt,
35 fast stoff (9,0 g; 90% utbytte) ble utvunnet. Smeltepunktet var 65 - 67°C.

TLC: $R_f = 0,65$ i tolueen (siliciumdioksyd gel-plater).
Rosa farge utvikler seg når produktflekken ble bestrålt med kortbølget UV-lys.

5

Analyse: Beregnet for: $C_{21}H_{30}O$: C, 84.51
H, 10.13
Funnet C, 84.49
H, 10.72.

10

Fremstilling av 7-(n-decyl)-2-metyl-4-(3',5'-diklorophen-4'-one)-indonaphthol.

- 15 7-decyl-2-metyl-1-naphtol (4,5 g, 15,1 g mmol) og 2,6-diklorquinon-4-klorimid (3,0 g, 14,3 mmol) ble oppløst i acetone (150 ml). Oppløsningen ble behandlet med 700 ml kaliumkarbonat-oppløsning (0,1 M, pH = 10,0). Oppløsningen ble omrørt kraftig ved værelsestemperatur i 10 minutter.
- 20 pH i reaksjonsblandingen ble justert til 2,8 med HCl (1,0 N). Blandingen ble omrørt i 15 minutter. Det røde faste stoffet ble utvunnet ved filtrering og vasket godt med vann. Det faste stoffet ble oppløst i tolueen og filtrert med glassfiber-papir for å fjerne alle uoppløselige materialer.
- 25 Filtratet ble oppkonsentrert og renset ved hjelp av en "Prep-500" siliciumdioksyd gel-kolonne med tolueen som den mobile fasen. Produktfraksjonene ble slått sammen og inn-dampet til tørrhet. Resten ble utkrystallisert med n-heksan (100 ml) hvorved man fikk produktet (3,9 g, 58%
- 30 utbytte).

TLC: $R_f = 0,26$ i tolueen (siliciumdioksyd gel-plater).
Den brune fargeflekken gikk over til fiolett-blå etter å være behandlet med 0,1 N NaOH på platene.

35

Analyse: Beregnet for: $C_{27}H_{31}NO_2Cl_2$: C, 68.64
H, 6.57; N, 2.97
Funnet C, 68.88
H, 6.85; N, 2.97.

Eksempel 2:Gelatin som en hydrofil bærergrunnmasse

- 5 En serie av ekseperimenter ble utført for å fremstille og evaluere prøveenheter og -innretningen ifølge foreliggende oppfinnelse hvor gelatin ble anvendt som den hydrofile bærergrunnmasse.
- 10 Det ble fremstilt en oppløsning av et hydrofobt hjelpemiddel som inneholdt en ionophore og et rapportørstoff ved å tilsette 60 mg valinomycin og 29 mg 7-n-decyl-MEDPIN til 4,27 g o-nitrofenyloktyl-eter ved oppvarming inntil
- 15 oppløsning ble oppnådd. En bufret gelatinoppløsning ble fremstilt ved å bruke 3.13 g type I gelatin som var blitt dialysert ved 10°C for å fjerne ioniske urenheter, og 20,8 g avionisert vann. Til dette ble det tilsatt 0,25 ml av en buffer fremstilt ved å justere 1 M "Trizma-base" til pH 8
- 20 med HCl og deretter til pH 5 med eddiksyre.
- Olje- og gelatinoppløsningene ble blandet og plassert i en 12-37 ml miniprøve-beholder i en "Waring"-blander og blandet i 2 minutter ved høy hastighet,
- 25 Etter henstand i 15 - 30 minutter ved 45°C for å la bobler stige opp, ble emulsjonen spredd utover en polyester-filmbærer som var blitt forbehandlet for å akseptere gelatin (40 GAB 2S) til en tykkelse på $171,45 \times 10^{-3}$ mm. Filmen ble
- 30 lufttørket, deretter ble 5 x 10 mm store stykker montert på polystyren-film-bærerhåndtak ved å bruke dobbeltsidig tape for å lage prøveinnretninger.
- Det ble fremstilt prøver som inneholdt 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 og 1,1 mM KCl, 100 nM tris-Cl pH 8.5. Disse konsentra-
- 35 sjonene svarer til de som ble funnet i plasma fortynnet 9 ganger. En 30 µl prøvedråpe ble plassert på reagensdelen

av en prøveinnretning og inkubert ved 37°C i et Seralyzer® reflektans spektrofotometer i 2,5 minutter og på dette tidspunkt ble refleksjonsfaktoren ved 640 nm målt. Dataene for refleksjonsfaktoren er stilt opp i tabellen nedenunder.

5

	K^+ (mM)	$(K/S)^2$
	0	0.1140
10	0.2	1.2839
	0.4	2.2822
	0.6	3.3909
	0.8	4.6256
	1.1	5.9271

15

$(K/S)^2$ er definert som

20

$$(K/S)^2 = \frac{(1-R)^4}{4R^2}$$

25

hvor R er den delen av refleksjonsfaktoren som stammer fra prøveinnretningen, K er en konstant og S er lys-spredningskoeffisienten til det bestemte reflekterende medium. Likningen ovenfor er forenklet form av den velkjente Kubelka-Munk-likningen (se Gustav Kortüm, "Reflectance Spectroscopy", s. 106-111, Springer Verlag, New York (1969)).

30

Dataene ovenfor er plottet i figur I, og viser at kalium-konsentrasjon svarer lineært til $(K/S)^2$. Videre viser dataene at forskjellige konsentrasjoner kan måles nøyaktig.

35

Eksperimentet ovenfor ble gjentatt ved å bruke 2-metyl-4-(3', 5'-diklorofen-4'-one) indonaphthol (MEDPIN) istedet for det n-decyl substituerte molekylet som rapportørstoff.

Følgelig ble det fremstilt en oppløsning som inneholder 6,7 mg/ml valinomycin og 1,67 mg/ml MEDPIN i o-nitro-fenyloktyl-eter. En vandig gelatinemulsjon ble fremstilt som ovenfor slik at emulsjonen inneholdt 12% eteroppløsning og 7% gelatin. En film av emulsjonen med et tykkelse i våt tilstand på 5 mm ble formet med en skavekniv på en polyesterbærer, tørket og montert på strimler av polystyrene-film.

Prøver med KCl ble fremstilt og prøveinnretningene evaluert slik som ovenfor. Dataene for refleksjonsfaktor oppstilt i tabellen nedenunder er vist grafisk i figur II.

K^+ (mM)	$(K/S)^2$
0	0.2048
0.2	1.4945
0.6	5.3038
1.2	8.4158

Dataene og deres plotting viser en lineær korrelasjon mellom K^+ konsentrasjon og $(K/S)^2$.

Eksperimentet ovenfor ble gjentatt med unntak av at 3-(n-pentalkyl)-3', 5'-diklorophen-4'-one-indofenol (DIP) ble brukt som rapportørstoff istedet for 7-n-decyl-MEDPIN.

DIP ble fremstilt av 3-n-pentadecylfenol og 2,6-diklor-quinon-4-klorimid (DQCl). Ekvimolare mengder av disse forbindelsene ble blandet i aceton for å gi en teoretisk konsentrasjon på ca. 100 mM av hver. Til hver ml oppløsning ble det tilsatt 6 ml buffer (pH = 10). Bufferen var 100 mM 3-(cykloheksylamino)-propansulfonsyre i vann. Den resulterende oppløsning ble justert til pH 2.6 med 1N HCl. Blandingen ble sentrifugert og bunnfallet tørket under nitrogenatmosfære.

En vandig gelatin-emulsjon ble fremstilt slik som ovenfor, men som inneholdt 9,66 vekt-% gelatin og 12,6 vekt-% NPOE. Valinomycin (15 mM) og DIP (25 mM) ble oppløst i oljen.

- 5 Dataene fra evalueringen av prøveinnretningen er stilt opp i tabellen under, og er tegnet opp grafisk i figur III.

	K^+ (mM)	$(K/S)^2$
10	0	0.8409
	0.2	1.0858
	0.6	1.5302
15	1.1	2.0794

Dataene og deres plotting viser en lineær korrelasjon mellom K^+ konsentrasjon og $(K/S)^2$.

20

Eksempel 3:

Agarose som den hydrofile bærergrunnmasse

25

En serie eksperimenter ble utført hvor prøveenheden og -innretningen ifølge foreliggende oppfinnelse ble fremstilt ved å bruke agarose som den hydrofile bærergrunnmasse.

30

En prøveinnretning ble fremstilt hvor den hydrofile bærergrunnmassen var agarose og det hydrofobe hjelpe-midlet var 2-nitrofenyloktyl eter (NPOE).

35

Oppløsningen ble fremstilt ved å oppløse 18.6 g valinomycin og 10,4 mg 7-n-decyl-MEDPIN i 1.52 ml NPOE ved oppvarming inntil oppløsningen inntrådte. En andre oppløsning ble

fremstilt som inneholdt 1,2 g agarose i 40 ml destillert vann ved 60°C. Til denne oppløsningen ble tilsatt 760 µl av en 1 mg/ml vandig oppløsning av "Zwittergent 3-10".

5 "Zwittergent" er et handelsnavn for N-decyl-N,N-dimetyl-3-ammonio-1-propansulfonsyre.

Disse oppløsningene ble emulgert i en beholder med kapasitet 12 til 37 ml på en "Waring"-blander innstilt på høy hastighet. Den resulterende emulsjon ble helt over i et 50 ml
10 beger-glass og plassert under et vakuum i 15 sekunder for å fjerne innesluttet luft. Deretter ble emulsjonen formet til en 1,3 mm (tykkelse i våt tilstand) film på "Bruning Drafting Film" ved å bruke en skavekniv. Etter tørking
15 ved værelsestemperatur i 16 timer, ble den tørkede emulsjon skåret opp i 5 ganger 10 mm store rektangler og montert på polystyrenfilm-strimler slik som ovenfor.

For å evaluere prøveinnretningen ble vandige oppløsninger av KCl med forskjellige konsentrasjoner fremstilt.
20 Disse oppløsningene ble bufret til pH 8,5 med Tris·HCl-buffer. Disse oppløsningene ble analysert som i eksemplene ovenfor med SERALYZER reflektans fotometer, og $(K/S)^2$ -verdier er gjengitt i den følgende tabell.

25

	K^+ (mM)	$(K/S)^2$
	0	0.0696
30	0.05	0.5313
	0.10	0.7026
	0.15	1.0242
	0.20	1.4149

35

Dataene er plottet grafisk i figur IV som viser en lineær korrelasjon mellom kalium-konsentrasjon og $(K/S)^2$.

Dette forholdet muliggjør differensiering av refleksjonsfaktormåling mellom forskjellige konsentrasjonsnivåer for K^+ .

5 Valinomycin (12,8 mg) og 7-n-decyl-MEDPIN (5.4 mg) ble oppløst i 760 μ l 2-nitrofenylbutyl eter under oppvarming. En andre oppløsning ble fremstilt ved å tilsette 600 mg agarose med lav geleringsstemperatur til 20 ml destillert
10 vann. Til denne vandige blandingen ble det tilsatt 38 μ l av en 10 mg/ml vandig oppløsning av "Zwittergent 3-16" (N-heksadecyl-N,N-dimetyl-3-ammonio-1-propansulfonsyre). Agarosen og 2-nitrofenylbutyl eter oppløsningene ble så emulgert i en 12-37 ml beholder på en "Waring"-laboratorie-
15 blander i 5 minutter ved en høy hastighetsinnstilling. Etter blanding fikk emulsjonen stå i 5 minutter for å la innsluttede luftbobler frigjøres.

Emulsjonen ble formet på "Gel Bond"-polyesterfilm ved å
20 bruke en 0,6 mm skavekniv. Etter lufttørring i en time ved værelsestemperatur, ble filmen plassert i en 40°C luftovn i 15 minutter. Filmen ble så kuttet opp i 5x10 mm store rektangler som ble montert på polystyrenfilmer som ovenfor og evaluert.

25 Data for refleksjonsfaktor ble samlet opp ved 640 nm under anvendelse av et SERALYZER reflektans-fotometer, og dataene ble omdannet til $(K/S)^2$ -verdier. Resultatene er stilt opp i tabellen nedenunder og er plottet grafisk i
30 figur V. De viser en lineær korrelasjon mellom kaliumionkonsentrasjon og $(K/S)^2$, som muliggjør nøyaktig analyse av konsentrasjon.

	K^+ (mM)	$(K/S)^2$
35	0	0.0915
	0.10	1.133
	0.15	1.750
	0.20	2.189

Valinomycin (12.8 mg) og 7-n-decyl-MEDPIN (5,4 mg) ble oppløst i 760 μ l dietyl phthalat ved oppvarming. En andre oppløsning ble fremstilt ved å tilsette 600 mg agarose og 38 μ l av en 10 mg/ml oppløsning av "Zwittergent 3-16" i vann til 20 ml destillert vann ved 60°C . De to oppløsningene ble blandet og emulgert. Den resulterende emulsjon ble plassert under vakuum i 15 sekunder for å fjerne innesluttede luftbobler.

En film av emulsjon med en tykkelse i fuktig tilstand på 1,3 mm ble formet på en "Gel Bond" film ved anvendelse av en skavekniv. Filmen fikk stå i 2 timer ved værelses-temperatur, deretter ble den tørket videre i en luftovn ved 40°C i ytterligere 30 minutter. Prøveinnretninger ble så fremstilt slik som ovenfor.

Prøveinnretningene ble evaluert ved å bruke vandige KCl oppløsninger som inneholdt en buffer av 3-(cykloheksyl-amino)-propansulfonsyre og LiOH (pH = 10). Resultatene er gjengitt i den følgende tabell.

	K^+ (mM)	$(K/S)^2$
25	0	0.0865
	0.5	0.3565
	1.0	0.7937
	1.5	1.2034
	2.0	2.0207

30

Dataene er plottet grafisk i figur VI. Dose/respons-kurven muliggjør lett differensiering mellom de forskjellige K^+ -nivåer.

35

Eksempel 4:Papir og hydrofil polymer som en sammensatt bærergrunnmasse

- 5 Det ble utført eksperimenter for ytterligere å fastslå
forgreningene av den hydrofile bærergrunnmasse.
I de følgende eksempler innesluttet finfordelte dråper
av et hydrofobt hjelpemiddel som inneholder ionophore og
rapportørstoff, i en hydrofil grunnmasse som omfatter
10 papir og agarose.

- Det ble fremstilt tre forrådsoppløsninger. Til den første
oppløsningen ble 28,4 mg 7-n-decyl-MEDPIN og 71,6 mg
(2,3-naphtho)-15-krone-5 tilsatt til 2 ml 2-nitrofenyl-
15 oktyleter, grundig blandet med en vortex blander i 5
sekunder og plassert i 10 - 20 minutter på et "Sybron
Thermolyne Dri-Bath" varmeapparat innstilt på 90°C inntil
alle reagensene var oppløst. En agaroseoppløsning ble
fremstilt ved å oppløse 1 g agarose i 20 ml vann ved 80°C.
20 Det ble fremstilt en zwitter-ionisk detergent oppløsning
ved å oppløse 50 mg "Zwittergent 3-10" i 20 ml vann.

- Det ble fremstilt en reagensemulsjon ved å blande 0,8 ml
av den første oppløsningen, 12,0 ml av agaroseoppløsningen,
25 0,8 ml av detergentoppløsningen og 1,4 ml destillert vann
og emulgere blandingen i en beholder av rustfritt stål
med kapasitet på 12 - 37 ml ved høy hastighet i 5 minutter
på en "Waring" laboratorieblender. Luft fikk slippe ut av
den oransjefargede emulsjonen i 5 minutter ved 60°C før
30 den ble tilført "Whatman 31 ET" papir ved å bruke en
"No. 75 Meyer"-stav. Papiret ble så tørket ved 60°C ovn
i 20 minutter. Et stykke dobbeltsidig akryltape ble
lagt på den ubelagte siden av papiret. De sammensatte
delene ble kuttet opp i 10 mm brede strimler som deretter
35 ble festet til en polystyrenbærer via den andre siden
av klebefilmen. Nok en oppkutting til 5 mm strimler ga så
reagensstrimler som hver besto av en 5 x 10 mm stor reagenspute

festet til et polystyrenhåndtak og egnet for bruk sammen med SERALYZER reflektansfotometer.

- 5 Prøving av strimlene ble utført ved å måle den diffuse refleksjonen ved 640 nm til den omsatte reagensputen under anvendelse av et SERALYZER instrument. Fem vandige oppløsninger av kaliumklorid bufret ved pH 9,0 med 100 mM boratbuffer ble brukt som prøver. På hvert kaliumnivå
- 10 ble det målt reaktiviteter til 3 strimler og gjennomsnittet ble beregnet. Resultatene er stilt opp i tabellen nedenunder.

15	K^+ (mM)	$(K/S)^2$
	0.8	0.1846
	0.12	0.2328
	0.16	0.3018
20	0.20	0.3532
	0.24	0.4440

- Resultatene indikerer utmerket analyseresultater for
- 25 varierende K^+ -konsentrasjoner slik det er vist ved plottingen av dataene ovenfor i figur VII.

Eksempel 5:

- 30 Bruk av TiO_2 som en bestanddel i bærergrunnmassen

- Det ble utført et eksperiment hvor prøveenhets og -innretningen ifølge foreliggende oppfinnelse ble fremstilt
- 35 ved å bruke TiO_2 som en tilleggsbestanddel i den sammensatte bærergrunnmasse. Resultatene viser forbedret evne til å bestemme ioner i en prøve.

En emulsjon av o-nitrofenyloktyl eter (NPOE) (12.6 vekt-%) og gelatin (9,6 vekt-%) i vann ble fremstilt. Før emulgering ble NPOE iblandet henholdsvis i 7-decyl -MEDPIN og valinomycin til 15 mM. Etter emulgering av NPOE/gelatin-blandingen med en "Waring" laboratorieblender ved høy hastighet ble den resulterende emulsjon spredd ut på en polyesterfilmbehandlet for å akseptere gelatin ("40 GAB, 2S"). Filmene ble jevnet ut til en tykkelse i våt tilstand på 0,17 mm (Nr. 75 Mayer-stav), 0,38 mm (skavekniv) og 0,76 mm (skavekniv). Filmene ble tørket ved værelsestemperatur i ca. 30 minutter.

Et andre sett med filmer ble fremstilt slik som ovenfor, med unntak av at 0,75 vekt-% TiO_2 -pulver ble iblandet (0,5 mM partikkelstørrelse). Filmene ble fordelt på "40 GAB 2S" polyesterfilm til en tykkelse i fuktig tilstand på 0,09 mm (Nr. 40 Mayer-stav), 0,17 mm (Nr. 75 Mayer-stav), 0,38 mm (skavekniv) og 0,76 mm (skavekniv).

Det ble skåret ut små rektangulære stykker (5 x 10 mm) fra begge filmsettene og montert til en ende av separate strimler av polystyren under anvendelse av en dobbelt sidig tape.

Det ble fremstilt prøver som inneholdt 0,2, 0,6, 1,1 og 3,3 mM KCl i 100 nM tris-hydroksymetylamino metan buffer (pH 8,0). En aliquot av hver prøve (30 μl) ble tilført en separat film og endringen i refleksjonsfaktoren overvåket i 130 til 150 sekunder i en SERALYZER. Reflektansverdiene ble omdannet til (K/S) slik som ovenfor. Resultant (K/S)-verdiene (endepunkt) er gjengitt i den følgende tabell.

5

10

15

20

25

30

35

Filmenes respons (K/S) på kalium

TiO ₂ (vekt-%)	Tykkelse (mm)	.2	(K ⁺) mM .6	1.1	3.3
0	0.17	.6300	1.1465	1.7825	2.970
0	0.38	.8470	1.5780	2.1685	3.600
0	0.76	1.0265	1.8555	2.545	4.029
+ 0,75%					
TiO ₂					
0.75%	0.9	.1781	.2833	.3596	.5474
0.75%	0.17	.1984	.3259	.4144	.6163
0.75%	0.38	.1924	.3147	.4064	.6052
0.75%	0.76	.1910	.2919	.3794	.5791

Dataene viser at varierende tykkelse på filmene som inneholder TiO_2 har liten virkning på (K/S) for en bestemt K^+ -konsentrasjon, mens det sees forholdsvis store differanser uten TiO_2 i utformingen.

5
10

15

20

25

30

35

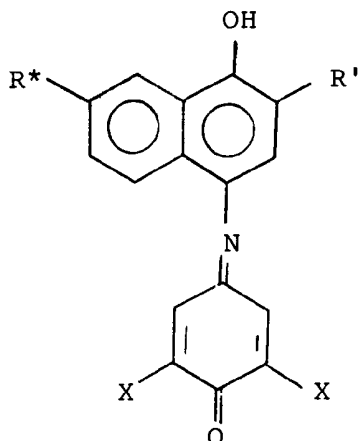
P a t e n t k r a v

1. Prøveenhet for å bestemme tilstedeværelsen av et ion i en vandig prøve,
k a r a k t e r i s e r t v e d at prøveenheden omfatter
5 en hydrofil bærergrunnmasse inkorporert med finfordelte dråper av et hydrofobt hjelpemiddel, idet hjelpemidlet inneholder
- en ionofor som er i stand til å danne et kompleks med ionet, og
 - 10 - en indikator som er i stand til ved gjensidig påvirkning med kompleks av ionofor og ion å gi en påvisbar respons, idet det hydrofobe hjelpemiddel har følgende egenskaper:
 - i) har tilstrekkelig hydrofobisitet til å isolere ionoforen og indikatoren fra den vandige prøve,
 - 15 ii) slippe bare gjennom ioner som reagerer med ionoforen,
 - iii) løser opp ionoforen og indikatoren,
 - iv) er uoppløselig i vann,
 - v) er ikke flyktig.
- 20 2. Prøveenhet ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den hydrofile bærergrunnmassen er gelatin eller agarose.
3. Prøveenhet ifølge krav 1 eller 2,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at agarose som den hydrofile bærergrunnmasse i tillegg omfatter papir.
4. Prøveenhet ifølge et av kravene 1-3.
k a r a k t e r i s e r t v e d at ionoforen er
30 valinomycin.
5. Prøveenhet ifølge et av kravene 1-4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at gelatin som den hydrofile bærergrunnmassen i tillegg er iblandet TiO_2 .
35

6. Prøveenhet ifølge et av kravne 1-5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at indikatoren er en
forbindelse med strukturen

5

10



15

hvor R' er laverealkyl, fortrinnsvis metyl, R* er H eller
middels alkyl, fortrinnsvis n-decyl, og X er halogen.

20

7. Anvendelse av prøveheten ifølge krav 5 eller 6 for
å bestemme tilstedeværelsen av et ion i en vandig prøve,
hvor enheten omfatter en avlang bærerdel med en øvre, i det
vesentlig plan overflate, og en prøvehet ifølge kravene
5-6 på den plane overflaten av bærerdelen, hvis prøve
bringes i kontakt med prøveheten for observering av påvis-
bar respons.

25

30

35

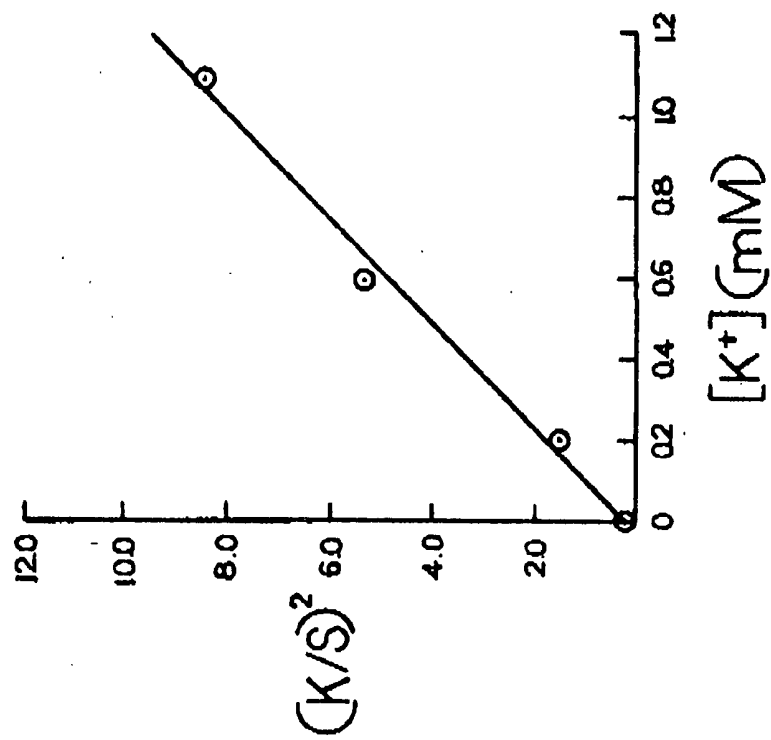


FIG. 2

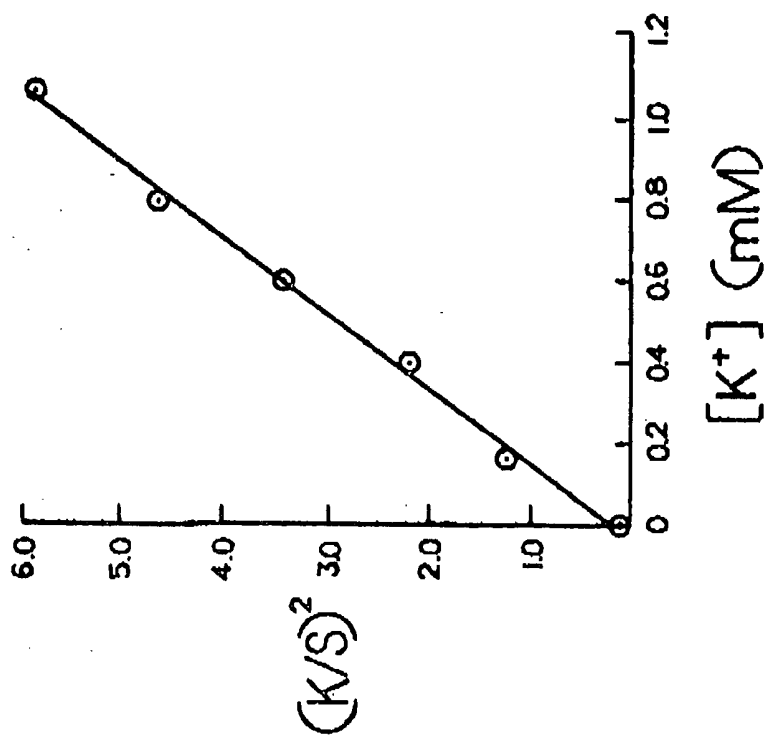


FIG. 1

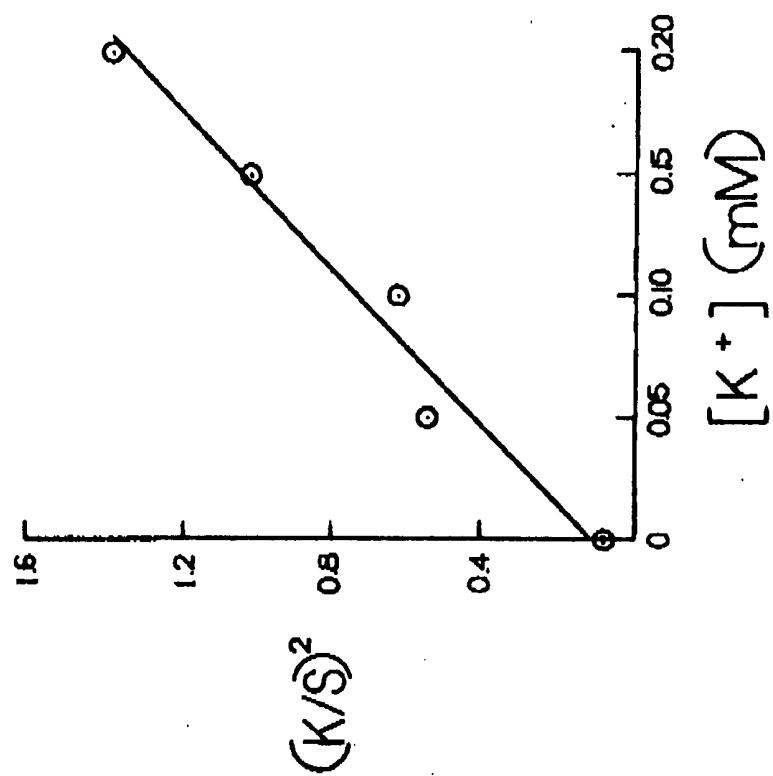


FIG. 4

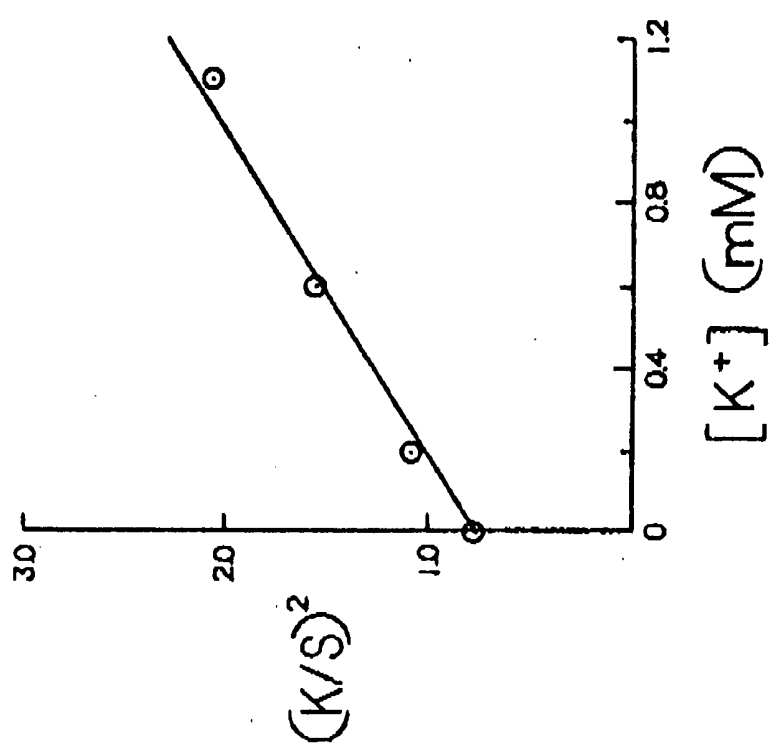


FIG. 3

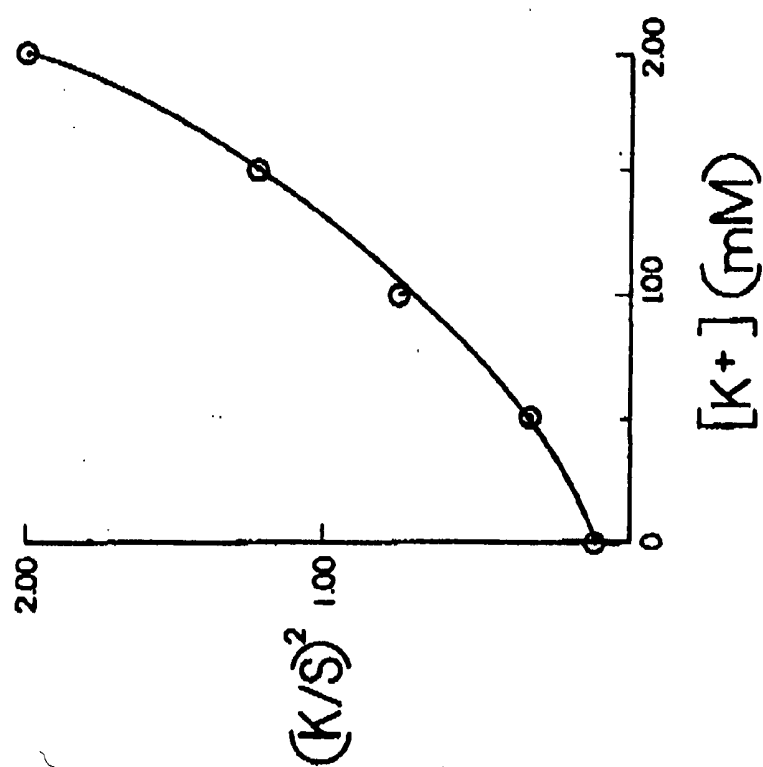


FIG. 6

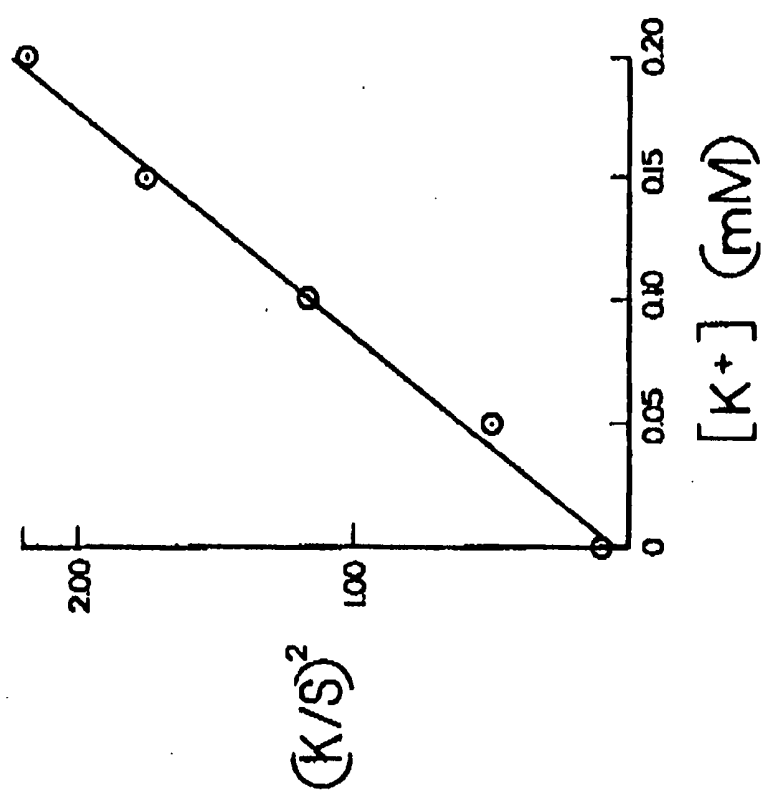


FIG. 5

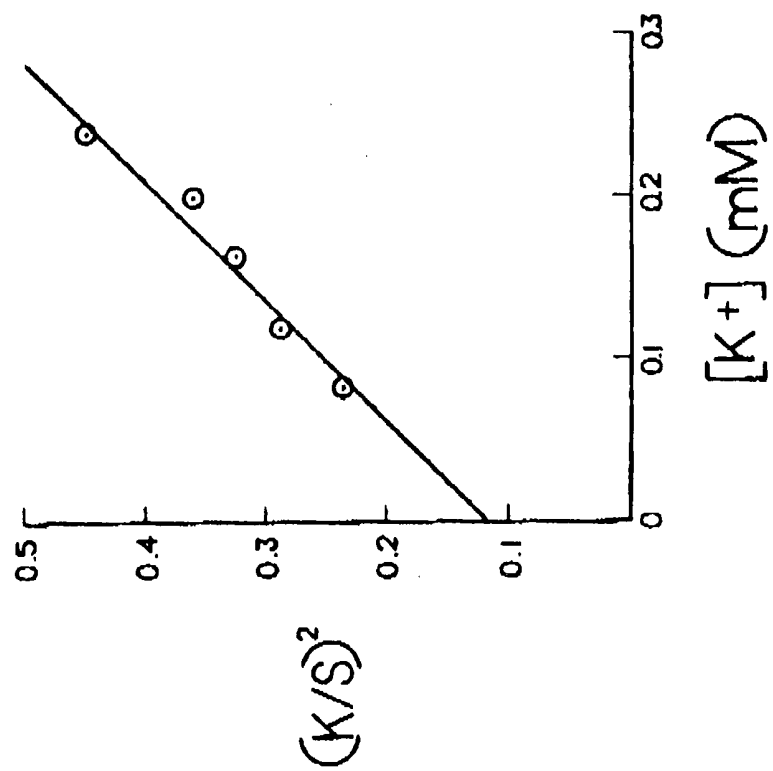


FIG. 8

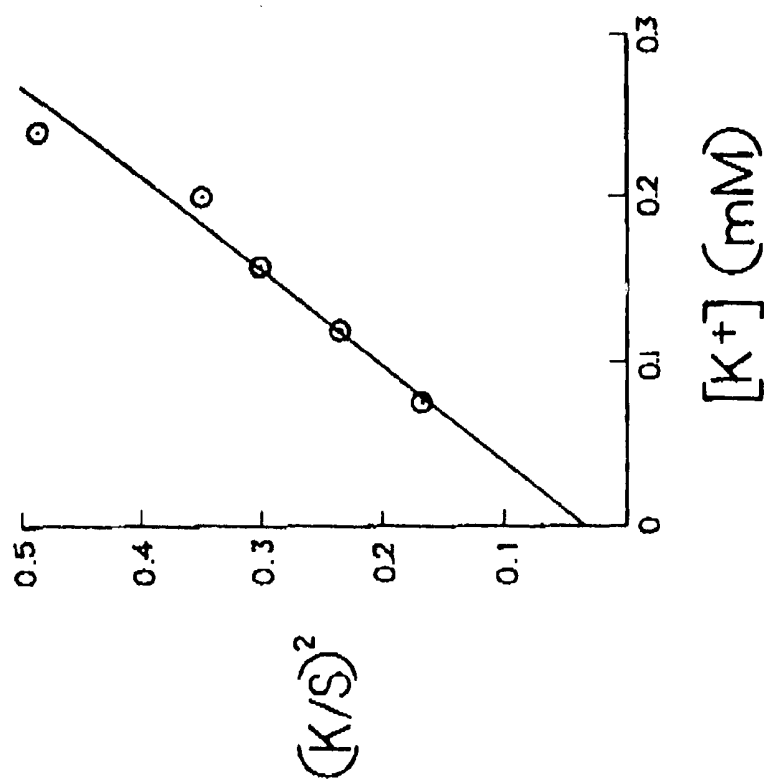


FIG. 7