



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁸: C 12 Q 1/54 G 01 N 21/47 G 01 N 33/52

(21) Patentansøgning nr: PA 1992 01570

(22) Indleveringsdag: 1992-12-29

(24) Løbedag: 1987-08-12

(41) Alm. tilgængelig: 1992-12-29

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2000-02-14

(30) Prioritet: 1986-08-13 US 896418

(73) Patenthaver: Lifescan, Inc., 2443 Wyandotte Street, Mountain View, California 94043, USA

(72) Opfinder: Roger Phillips, 845 Richardson Court, Palo Alto, California 94303, USA
Geoffrey McGarraugh, 291 Hacienda Drive, Scotts Valley, California 95066, USA
Frank Jurik, 142 16th Avenue, San Mateo, California 94402, USA
Ray Underwood, 146005 Paynes Creek Road, Red Bluff, California 96080, USA

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard, Lehmann & Ree A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark

(54) Benævnelse: Reagensteststrimmel til anvendelse i et apparat til bestemmelse af en fuldblodprøves blodglukosekoncentration

(56) Fremdragne publikationer:

WO A 8100622

Clinical Chemistry, bind 27 (1981), side 1287-1290

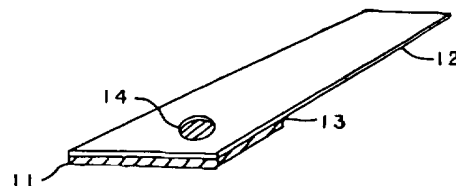
EP A 112166

GB A 2090659

EP A 110173

(57) Sammendrag:

Fremgangsmåde til bestemmelse af glucose i en blodprøve indebærer optagelse af reflektansmålinger fra én overflade af en inert porøs matrix imprægneret med et reagens, der vil reagere med en analyt til frembringelse af et lysabsorberende reaktionsprodukt, når den væske, der skal analyseres, påføres den anden overflade og vandrer gennem matrixen til den overflade, der skal aflæses. Reflektansmålinger foretages ved to forskellige bølgelængder for at eliminere interferenser, og et tidstagningskredsløb udløses af en begyndelsesnedgang i reflektansen ved befugtning af den overflade, hvis reflektans skal måles, med den væske, der vandrer gennem den inerte matrix.



Fremgangsmåden og apparatet er specielt velegnet til at måle glucose i fuldblod, idet det ikke er nødvendigt at fraskille de røde blodlegemer fra serum eller plasma.

FIG. 1

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til kolorimetrisk bestemmelse af glukose specielt i fuldblod.

Kvantificeringen af kemiske og biokemiske komponenter i farvede vandige væsker, specielt i farvede biologiske væsker som f.eks. blod og urin og biologiske væskederivater som f.eks. serum og blodplasma er af stadig stigende vigtighed. Det er vigtigt inden for den medicinske diagnose og behandling at kunne anvende disse bestemmelser og ved kvantificeringen, når patienter har været udsat for terapeutiske lægemidler, giftstoffer, farlige kemikalier og lignende. I visse tilfælde er mængderne af de materialer, der skal bestemmes, enten så minimale i området mikrogram eller mindre pr. deciliter, eller så vanskelige præcis at bestemme, at det anvendte apparat er kompliceret og kun kan anvendes af trænet laboratoriepersonale. I dette tilfælde er resultaterne først tilgængelige i løbet af nogle timer eller dage efter prøveudtagningen. I andre tilfælde er det ønskeligt at man kan anvende ikke-trænede personer til at udføre undersøgelser rutinemæssigt kvikt og reproducerbart uden for et laboratorium, idet man skal have hurtig eller umiddelbart information.

Et almindelig medicinsk test er målingen af blodglukoseniveauer hos diabetikere. Det anbefales for øjeblikket diabetiske patienter at måle der blodglukoseniveau fra 2 til 7 gange om dagen afhængig af arten og sværhedsgraden af det enkelte tilfælde. Baseret på det observerede mønster i de målte glukoseniveauer kan patienten og den behandelende læge sammen foretage justering af diæten, af fysiske øvelser og insulindoseringen for bedre at kunne holde sygdommen under kontrol. En sådan information bør naturligvis være til rådighed for patienten straks.

En metode der for øjeblikket anvendes i udstrakt grad i USA anvender en testanordning af den type, der er beskrevet

vet i USA patentskrift nr. 3 298 789. Ved denne fremgangsmåde anbringes en prøve af frisk fuldblod (typisk 20-40 μ l) på en ethylcellulosebeklædt reagenspude indeholdende et enzymssystem, der udviser glukoseoxidase og peroxidaseaktivitet. Enzymsystemet reagerer med glukose og frigør hydrogenperoxid. Puden indeholder også en indikator, der reagerer med hydrogenperoxidet i nærværelse af peroxidase til opnåelse af en farve, der er proportional i en farvestyrke med prøvens glukoseindhold.

10

En anden populær glukosetestmetode anvender lignende kemi, men anvender i stedet for ethylcellulose-beklædte puder en vandresistent film, i hvilken enzymerne og indikatorerne dispergeres. Et sådan system er omhandlet i USA patentskrift nr. 3 630 957.

15

I begge tilfælde er prøven i kontakt med reagenspuden i et vist tidsrum (typisk 1 minut). I det første tilfælde vaskes blodprøven herefter af med en vandstrøm, medens den i det andet tilfælde tørres af filmen. Reagenspuden eller filmen trykkes herefter tør og bedømmes. Bedømmelsen foretages enten ved at sammenligne den opståede farve med farvekort eller ved at anbringe puden eller filmen i et diffust reflektionskoefficient instrument til aflæsning af farveintensitetsværdien.

25

Medens de ovennævnte metoder har været anvendt til kontrol af glukose i nogle år, har de visse begrænsninger. Den nødvendige prøve er temmelig stor for et tæt foretaget ved et prik i fingeren og er vanskelig at udføre for visse mennesker, hvis capillarblod ikke hurtigt kan trykkes ud.

30

Herudover har disse metoder en fælles begrænsning med andre simple colorimetrisk bestemmelser foretaget af ikke faguddannet personale, at deres resultat er baseret på

35

en absolut farve aflæsning, der for sit vedkommende er re-
lateret med den absolutte reaktionsgrad mellem prøven og
forsøgsreagenserne. Den kendsgerning, at prøven skal vas-
kes eller tørres af reagensspuden efter den udmålte reak-
5 tionstid kræver, at brugeren er parat efter den nødvendige
tid og kan aftørres eller vaskes på det krævede tids-
punkt. Den kendsgerning at reaktionen afbrydes ved at
fjerne prøven, giver en vis usikkerhed i resultatet, spe-
cielt når prøven foretages i hjemmet. Overvask kan give
10 lave resultater og undervask kan give høje resultater.

Et andet problem, der ofte eksisterer i forbindelse med
simple kolorimetrisk bestemmelser foretaget af ikke træ-
net personale er nødvendigheden af, at begynde en tidsbe-
15 stemmelse, når blodet påføres en reagensspude. En bruger
vil typisk have udført et prik i fingeren for at opnå en
blodprøve og det vil derefter være nødvendigt samtidigt
at påføre blodet fra fingeren på reagensspuden, medens man
begynder tidstagningen med den anden hånd, hvorved det er
20 nødvendigt at anvende begge hænder samtidigt. Dette er
specielt vanskeligt, da det ofte er nødvendigt at sikre
at tidstagningen startes i det øjeblik, når blodet påfø-
res reagensspuden. Alle tidligere kendte metoder kræver
yderligere manipulationer eller yderligere installationer
25 for at opnå dette resultat. Derfor er en simplificering
af reflekstans aflæsningsinstrumenter ønskelig.

Tilstedeværelsen af røde blodceller eller andre farvede
komponenter griber ofte ind i målingerne af disse abso-
30 lutte værdier, hvilket kræve udelukkelse af røde blodcel-
ler i de to tidligere fremgangsmåder, der er mest an-
vendt. I udstyret i patentskrift nr. 3 298 789 forhindrer
en ethylcellulosemembran at blodcellerne går ind i rea-
gensspuden. På lignende måde forhindrer en vandresistens
35 film i patentskrift nr. 3 630 957 at blodceller går ind.
I begge tilfældene virker afrensningen eller aftørringen

også for at fjerne disse potentielt interfererende blodceller inden selve målingen.

Der er derfor et behov for et system til afsløring af
5 analytter i farvede væsker som f.eks. blod, der ikke kræver fjernelse af overskud af væske fra reflektionskoefficientstrimmelen, fra hvilken selve reflektionskoefficientaflæsningen skal foretages.

10 Opfindelsen tilvejebringer således en reagensteststrimmel af den i indledningen til krav 1 angivne art, der er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

15 Eksempler på det diagnostiske forsøgssystem, omfattende anvendelse af reagensteststrimlen ifølge opfindelsen, er bestemmelsen af glukose i fuldblod, hvor bestemmelsen foretages uden interferens af blodet og uden en kompliceret forsøgsmetode, der kan påvirkes af
20 brugerfejl.

Den foreliggende opfindelse kan beskrives lettere, når der henvises til de følgende tegninger, hvor

25 fig. 1 er et perspektivisk afbildning af en udførelsesform af testudstyret indeholdende aflæsningspuden, hvorpå den væske, der skal analyseres, påføres;

fig. 2 er et skematisk blokdiagram af et apparat, der
30 kan anvendes ved udførelsen af opfindelsen, og

fig. 3 er et skematisk blokdiagram af et andet apparat, der kan anvendes ved udførelsen af opfindelsen.

35 Den foreliggende opfindelsen tilvejebringer en forbedret hurtig og simpel metodologi, der anvender et pålideligt

og let anvendeligt apparat til bestemmelse af analytter som f.eks. glukose, der specielt involverer et enzymsubstrat, hvilket resulterer i frembringelsen af hydrogenperoxid som et enzymprodukt. Fremgangsmåden indebærer at man på et porøst matrix påfører et ringe rumfang fuldblod, tilstrækkeligt til at mætte matrixen. Bundet til matrixen er en eller flere reagenser af et signalproducerende system, hvilket resulterer i frembringelsen af et produkt, der bevirker en begyndelsesforandring i størrelsen af matrixen reflektionskoefficient. Matrixen forefindes typisk i et reflektionskoefficientmålende apparat, når blod tilføres. Væskeprøven trænger gennem matrixen, hvilket bevirker en begyndelsesforandring i reflektionskoefficient på måleoverfladen. En aflæsning foretages en eller flere gange efter begyndelsesforandringen i reflektionskoefficient for at relatere yderligere forandring i reflektionskoefficient på måleoverfladen eller i matrixen som et resultat af dannelsen af et reaktionsprodukt med mængden af analyt i prøven.

20

Til målinger i blod, specielt glukosemålinger, anvendes typisk fuldblod som et forsøgssubstrat. Matrixen indeholder et oxidaseenzym, der frembringer hydrogenperoxid. I matrixen findes også et andet enzym, specielt en peroxidase, og et farvesystem, der frembringer et lysabsorberende produkt sammen med peroxidasen. Det lysabsorberende produkt forandrer reflektionskoefficientsignalet. Med fuldblod foretages aflæsninger på to forskellige bølgelængder, idet aflæsningen ved en bølgelængde anvendes til at fjerne baggrundsinterferensen forårsaget af hematocrit, blodoxygenering og andre variable, der kan påvirke resultatet.

Et reagenslement anvendes, der omfatter matrixen og dele af det signalproducerende system indeholdt i matrixen.

35

Reagenselementet kan omfatte andre komponenter til specielle formål. Fremgangsmåden kræver at man tilføjer et lille rumfang blod, der typisk ikke er underkastet forudgående behandling (bortset fra en eventuel behandling med et antikoagulerende middel) til matrixen. Tidstagning af målingen aktiveres automatisk af apparatet ved at afsløre en forandring i reflektionskoefficient af matrixen, når væsken trænger gennem matrixen. Forandringen i reflektionskoefficient over en forud bestemt tidsperiode som et resultat af dannelsen af reaktionsprodukt relateres herefter med mængden af analyt i en prøve.

Den første komponent af den omhandlede opfindelse der skal beskrives er et reagenselement, bekvemt i form af en pude, der omfatter en inert porøs matrix og komponenten eller komponenter af et signalproducerende system, hvilket system er i stand til at reagere med en analyt til frembringelse af et lysabsorberende reaktionsprodukt, der trænger ind i den porøse matrix ved porer. Det signalproducerende system påvirker ikke signifikans væskestrømmen gennem matrixen.

For at hjælpe med aflæsningen af reflektionskoefficienten foretrækkes det, at matrixen har mindst en side, der er i det væsentlige glat og flad. Typisk er matrixen udformet i en tynd folie med mindst en glat flad side. Under brugen påføres væskeprøven, der skal analyseres, på den ene side af folien, hvorved eventuelt tilstedeværende forsøgsforbindelse går gennem reagenselementet ved hjælp af capillær virkning, lægevirkning, graviditetsstrømning og/eller diffusionsindvirkning. Komponenterne i det signalproducerende system til stede i matrixen vil reagere til opnåelse af et lysabsorberende reaktionsprodukt. Indfaldende lys støder imod reagenselementet på et sted, der er forskellig fra det sted, hvor prøven er påført. Lys

reflekteres fra elementets overflade som diffus reflekteret lys. Dette diffuse lys opsamles og måles f.eks. ved hjælp af detektoren af et reflektionskoefficientspektrofotometer. Mængden af reflekteret lys vil være relateret med mængden af analyt i prøven, idet den sædvanligvis er en omvendt funktion af mængden af analyt i prøven.

Hver af de nødvendige bestanddele til frembringelse af reagenselementet beskrives nedenfor. Den første komponent er selve matrixen.

Matrixen vil være en hydrofil porøs matrix, hvortil reagenser kan bindes kovalent eller ikke-kovalent. Matrixen vil muliggøre strømning af det vandige medium gennem matrixen. Det vil også muliggøre binding af proteinformbindelser til matrixen uden signifikant at have uheldig indvirkning på den biologiske aktivitet af proteinet f.eks. enzymatisk aktivitet af et enzym. I den udstrækning at proteiner skal bindes kovalent, vil matrixen indeholde aktive pladser til kovalent binding eller være aktiveret på kendt måde. Matrixens sammensætning vil være reflekterende og vil være af tilstrækkelig tykkelse til at muliggøre dannelsen af en lysabsorberende farve i det tomme rumfang eller på overfladen for i det væsentlige at påvirke matrixens reflektant. Matrixen kan være en ensartet komposition eller et overtræk på et substrat, der giver den nødvendige struktur og de nødvendige fysiske egenskaber.

Matrixen deformeres sædvanligvis ikke ved opfugtning, idet den bibeholder sin oprindelige form og størrelse. Matrixen har en defineret absorptionsevne, således at det rumfang, der absorberes, kan kalibreres inden for passende grænser, idet variationer sædvanligvis holdes under ca. 50%, fortrinsvis på ikke mere end 10%. Matrixen vil have tilstrækkelig vådstyrke til at muliggøre rutinemæs-

sig fremstilling. Matrixen vil muliggøre at ikke-kovalent bundne reagenser er forholdsvis ensartede fordelt på matrixens overflade.

- 5 Som eksempler på matrixoverflader kan nævnes polyamider, specielt for prøver, der omfatter fuldblod. Polyamiderne er sædvanligvis kondensationspolymere af monomer med fra 4 til 8 carbonatomer, hvor de monomere er lactamer eller kombinationer af diaminer og di-carboxylsyrer. Andre polymerforbindelser med lignende egenskaber kan også anvendes. De polymere materialer kan modificeres til indførelse af andre funktionelle grupper, der tilvejebringer ladningsstruktur, således at overfladen af matrixen kan være neutral, positiv eller negativ såvel som neutral, basisk eller sur. Foretrukne overflader er positivt ladede. Når de anvendes med fuldblod har den porøse matrix fortrinsvis porer med en gennemsnitsdiameter i området fra ca. 0,1 til 2,0 μm , mere foretrukket fra ca. 0,6 til 1,0 μm .
- 20 En foretrukken metode at fremstille den porøse matrix på er at støbe den hydrofile polymer på en kerne af ikke-vævede fibre. Kernefibrene kan være et hvilket som helst fibrøst materiale, der tilvejebringer den beskrevne udformning og styrke som f.eks. polyesterepolyamider. Reagenset, der vil danne det lysabsorberende reaktionsprodukt, der omtales nærmere nedenfor, findes i matrixens porer, men blokerer ikke matrixen, således at væskedelen af forsøgssubstratet som f.eks. det blod, der skal analyseres, kan flyde gennem porerne på matrixen, medens partikler som f.eks. erythrocyter fastholdes på overfladen.

Matrixen er i det væsentlige reflekterende, således at den giver en diffus reflektionskoefficient uden anvendelse af en reflekterende baggrund. Fortrinsvis reflekteres mindst 25%, mere foretrukket mindst 50% af det indfaldne lys påført matrixen og udsendes som diffusreflektionsko-

efficient. En matrix på mindre end ca. 0,5 mm tykkelse anvendes sædvanligvis, idet fra 0,01 til 0,3 mm er det foretrukne. En tykkelse på fra 0,1 til 0,2 mm er det mest foretrukne, specielt for en nylonmatrix.

5

Typisk vil matrixen være knyttet til en holder for at give den fysisk form og stivhed, skønt dette ikke er nødvendigt. Fig. 1 viser en udførelsesform af opfindelsen, hvor en tynd hydrofil matrixpude 11 er anbragt ved den ene ende af en plastholder 12 ved hjælp af et klæbemiddel 13, der direkte og kraftigt fastholder reagenspuden til håndtaget. Et hul 14 findes i plastholderen 12 i det område, hvortil reagenspuden 11 er fastgjort, således at prøven kan påføres på den ene side af reagenspuden og lys reflekteres fra den anden side.

En væskeprøve, der skal undersøges, påføres puden 11. Hvis det f.eks. er blod, der skal undersøges, vil reagenspuden være af størrelsesordenen ca. 10 mm² til 100 mm² i overfladeareal, specielt 10 mm² til 50 mm² i areal, hvilket normalt er et rumfang, som 5-10 mikroliter af prøven vil mere end mætte.

Diffuse reflektionskoefficientmålinger af kendt art er typisk blevet foretaget under anvendelse af en reflekterende belægning knyttet til eller anbragt bag matrixen. En sådan belægning er ikke nødvendig og vil normalt ikke forefindes i forbindelse med den omhandlede opfindelse, enten som en del af reagenselementet eller reflektionskoefficientapparatet.

Som det vil fremgå af fig. 1 indeholder understøttelsesreagenspuden 11, således at en prøve kan påføres den ene side af reagenspuden, medens lysreflektionskoefficient er målt fra den anden side af reagenspuden modsat det sted, hvor prøven er påført.

Fig. 2 viser et system, hvori reagenset er påført den side med hullet i støttehåndtaget, medens lys reflekteres og måles på den anden side af reagenspuden. Andre udformninger end den afbillede kan anvendes. Pudene kan have forskellig udformning afhængig af de definerede grænser. Pudene vil være tilgængelig på mindst en overflade og sædvanligvis to overflader.

10 Det hydrofile lag (reagenselementet) kan være knyttet til understøttelsen på almindelig måde f.eks. ved hjælp af en holder, klemme eller klæbemidler; imidlertid er en foretrukken fremgangsmåde at det er bundet til støtten. Bindingen kan foretages med et hvilket som helst ikke reaktivt klæbemiddel, ved termisk behandling, hvor støttens overflade smeltes nok til at indeslutte noget af det materiale, der anvendes som det hydrofile lag eller ved hjælp af mikrobølge eller ultralydsbindingsmetoder, der ligeledes sammenkobler den hydrofile prøvepude med støtten. Det er vigtigt, at bindingen er således, at den ikke i det væsentlige griber ind i de diffuse reflektionskoefficientmålinger eller den reaktion der skal måles, skønt dette er sandsynligt ikke at forekomme da der ikke behøver være noget klæbemiddel til stede på det sted, hvor aflæsningen foregår. F.eks. kan klæbestoffet 13 påføres støttestrimmelen 12 først efterfulgt af udstandsning af hullet 14 i den kombinerede strimmel og klæbemiddel og herefter påføre reagenspuden 11 til klæbestoffet i nærheden af hullet 14, således at den ydre del af reagenspuden 30 knyttes til støttestrimmelen.

Et hvilket som helst signalproducerende system kan anvendes, der er i stand til at reagere med analytten i prøven til frembringelse (enten direkte eller indirekte) af en forbindelse, der er karakteristisk absorptiv ved en bøl-

gelængde forskellig fra en bølgelængde, ved hvilket forsøgssubstratet i det væsentlige absorberer.

Polyamidmatrixer er specielt værdifulde til at udføre reaktioner, ved hvilket et substrat (analytten) reagerer med et oxygenforbrugende oxidaseenzym på en sådan måde, at der frembringes et produkt, der yderligere reagerer med et farvestofmellemprodukt til dannelse enten direkte eller indirekte af en farve, der absorberer i et forud bestemt bølgelængdeområde. F.eks. kan et oxidaseenzym oxidere et substrat og frembringe hydrogenperoxid som reaktionsprodukt. Hydroperoxidet kan herefter reagere med et farvestofmellemprodukt eller præcursor ved en katalyseret eller ikke-katalyseret reaktion til frembringelse af en oxideret form af mellemproduktet eller prækursoren. Dette oxiderede materiale kan frembringe det farvede produkt eller reagere med en anden præcursor til dannelse af den endelige farve.

Ikke-begrænsende eksempler på analyser og typiske reagenser omfatter følgende materialer angivet nedenfor.

	<u>Analytter og prøvetyper</u>	<u>Reagenser</u>
25	Glukose i blod, serum, urin eller andre biologiske væsker, vin, frugtsafter eller andre farvede vandige væsker. Fuldblod	Glukose, Oxidase, peroxidase og en oxygenacceptor
30	er en særlig foretrukken prøvetype.	Oxytenacceptorer omfatter: O-dianisidin (1) O-toluidin O-tolidin (1) Benzidin (1) 2,2'-azinodi-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsyre-(6))
35		(1)

- 5 3-methyl-2-benzothiazoli-
nonhydrazon plus N,N-di-
methylanilin (1)
Phenol plus 4-aminophena-
zon (1)
Sulfoneret 2,4-dichlor-
phenol plus 4-amino-phena-
zon (2)
- 10 3-methyl-2-benzothiazoli-
nonhydrazon plus 3-(dime-
thylamino)benzoesyre (3)
2-methoxy-4-allylphenol
(4)
- 15 (1) Som angivet i Clinical Chemistry, Richterich og Co
lumbo, p. 367 og referencer omtalt deri
- (2) Analyst, 97, (1972) 142-5
- 20 (3) Anal. Biochem. 105, (1980) 389-397
- (4) Anal. Biochem, 79, (1977) 597-601
- 25 (5) Clinica Chemica Acta, 75, (1977) 387-391, idet der
herved henvises til alle ovenstående referencer.

Den omhandlede analysemetode hviler på en forandring i
absorbans, en måling af diffus reflektionskoefficient,
30 der er afhængig af mængden af tilstedeværende analyt i
den prøve, der skal undersøges. Denne forandring kan be-
stemmes ved at måle forandringen i absorbans af forsøgs-
prøven mellem to eller flere tidspunkter.

Det første trin i undersøgelsen er påførsel af prøven til matrixen. I praksis udføres en analyse på følgende måde: Først opnås en prøve af vandig væske indeholdende en analyt. Blod kan f.eks. opnås ved prik i en finger. Et overskud over mætning af matrix i det område, hvor refleksionskoefficienten skal måles (dvs. 5-10 microliter) af væsken påføres reagenselementet eller elementerne i testudstyret. Samtidig start af en tidsmåler er ikke nødvendig (hvad der er almindeligt i de tidligere kendte metoder), hvilket vil blive nærmere beskrevet nedenunder. Overskud af væske kan fjernes f.eks. ved let aftrykning, men en sådan fjernelse er heller ikke nødvendig. Testudstyret er typisk anbragt i et instrument til aflæsning af lysabsorbans dvs. farveintensitet ved hjælp af refleksionskoefficient inden påførsel af prøven. Absorbansen måles på hvilket tidspunkt efter påførsel af prøven. Absorbans i nærliggende beskrivelse er ikke alene lys inden for det synlige bølgelængdeområde men også uden for det synlige bølgelængdeområde som f.eks. infrarød og ultraviolet stråling. Fra disse målinger af absorbans kan en bedømmelse af farveudvikling kalibreres som udtryk for analytmængden.

Et passende instrument som f.eks. et diffust reflektionskoefficientspektrofotometer med passende software kan indstilles til automatisk at aflæse reflektionskoefficient på visse tidspunkter, beregnet forandring i reflektionskoefficient og under anvendelse af kalibreringsfaktorer mængden af analyt i den vandige væske. En sådan anordning er skematisk vist i fig. 2, hvor et omhandlet forsøgsudstyr består af en støtte 12 hvortil reagenspuden 11 er fastgjort som vist. Lyskilden 5, f.eks. en højintensitetslysimiterende diode (LED) kaster en lysstråle på reagenspuden. En væsentlig del (mindst 25%, fortrinsvis mindst 35% og foretrukket mindst 50% uden reaktionsprodukt) af dette lys er diffust reflekteret fra reagenspu-

den og afsløres af lysdetektoren 6 f.eks. en fototransistor, der frembringer en udgående strøm, der er proportional med det modtagende lys. Lyskilden 5 og/eller detektoren 6 kan eventuelt tilpasses til at frembringe eller svare på en speciel bølgelængde. Udladningen fra detektoren 6 går gennem forstærkeren 7 f.eks. et lineært integreret kredsløb, der omdanner fototransistorstrømmen til en spænding. Outputet af forstærkeren 7 kan føres til "track and hold circuit 8". Dette er en kombination af et linært/digitalt integreret kredsløb, der sporer eller følger den analoge sending fra forstærkeren 7 og efter befaling fra mikroprocessoren 20 låser eller fastholder spændingen på niveauet på det pågældende tidspunkt. Analog-til-digital konverteren 19 tager den analoge spænding fra "track and hold circuit 8" og omdanner det f.eks. til 12-bit binære digitaltal efter styring af mikroprocessor 20. Mikroprocessor 20 kan være et digitalt integreret kredsløb. Det tjener følgende kontrolfunktioner: 1) timing af hele systemet; 2) aflæsning af outputet af analog/digitalkonverteren 19; 3) sammen med program og datahukommelse 21 lagring af resultater svarende til den målte reflektionskoefficient med særlige tidsintervaller; 4) beregning af analyt niveauer ud fra de lagrede reflektionskoefficienter og 5) angivelse af analytkoncentrationsdata til displayet 22. Hukommelsen 21 kan være et digitalt integreret kredsløb, der lagrer data og mikroprocessoroperationsprogrammet. Rapporteringsanordningen 22 kan have forskellige hårdkopi eller blødkopiformer. Sædvanligvis er det et visuelt display som f.eks. et flydende krystal eller LED display, men det kan også være en printer eller et høreligt signal eller lignende. Instrumentet kan omfatte en start-stop kontakt og kan tilvejebringe et høreligt eller synligt tidssignal for at indikere tider til påførsel af prøve, udførsel af aflæsninger og lignende, dersom dette ønskes.

I den omhandlede opfindelse kan selve reflektionskoefficientkredsløbet anvendes til at påbegynde tidstagning ved at måle fald i reflektionskoefficient, der forekommer, når den vandige del af suspensionsopløsningen påføres reagenspuden (f.eks. blod) vandre til den overflade, ved 5 hvilken reflektionskoefficienten måles. Typisk er måleanordningen indstillet på "parat", ved hvilken reflektionskoefficientaflæsninger automatisk foretages med tætte intervaller (typisk ca. 0,2 sekunder) fra den typisk off- 10 hvide, i det væsentlige tørre, uomsatte reagensdræn. Den første måling foretages typisk inden gennemtrængning af matrix med væsken, der skal analyseres, men kan foretages efter væsken er blevet påført på et sted på reagenselementet, hvor der ikke måles reflektionskoefficient. Re- 15 flektionskoefficientværdien bedømmes af mikroprocessoren, typisk ved at lagre efter hinanden følgende værdi i hukommelsen og herefter sammenligne hver værdi med den oprindelige uomsatte værdi. Når den vandige opløsning trænger gennem reagensmatrixet, signalerer faldet i reflektionskoefficienten starten af måletidsperioderne. Fald i 20 reflektionskoefficienten på 5-50% kan anvendes til at begynde tidstagning, typisk et fald på ca. 10%. På denne enkle måde er der en nøjagtig synkronisering af forsøgs-substratet, der når overfladen, hvorfra målingen tages, 25 og begyndelsen af rækken af aflæsninger, uden at der skal foretages noget af brugeren.

Skønt hele det beskrevne system specielt er rettet på anvendelsen af polyamidmatrixer og specielt på anvendelsen 30 af sådanne matrixer til at bestemme koncentrationen af forskellige sukkerarter, som f.eks. glukose og andre materialer af biologisk oprindelse er der intet behov for at begrænse det reflektionskoefficientregistrerende aspekt af opfindelsen til disse matrixer. F.eks. kan den anvendte 35 matrix med reflektionskoefficientregistrering være dannet af et hvilket som helst vandopløseligt hydrofilt

materiale og en hvilken som helst anden type reflektionskoefficientforsøg.

5 Et særligt eksempel med hensyn til at afsløre glukose i nærvær af røde blodceller vil nu blive beskrevet for at større detaljer og særlige fordele kan påpeges. Skønt dette repræsenterer en foretrukken udførelsesform for den omhandlede opfindelse er opfindelsen ikke begrænset til afsløring af glukose i blod.

10

Anvendelsen af polyamidoverflader til dannelse af reagentelementet giver en række ønskelige egenskaber ved den omhandlede opfindelse. Disse er, at reagentelementet er hydrofilt (dvs. optager reagentet og prøven let), ikke 15 deformeres under befugtning (således at der tilvejebringes en flad overflade til reflektionskoefficientaflæsning), er forenelig med enzymer (for at opnå god lagringsstabilitet), optager et begrænset prøverumfang pr. enhed rumfang af membranen (nødvendig for at påvise en 20 forlænget dynamisk række af målinger) og viser tilstrækkelig våd styrke til at muliggøre rutinemæssig fremstilling.

I en typisk udformning udføres fremgangsmåden under anvendelse af et apparat, der består af en plastholder og 25 reagentelementet (matrixen indeholdende det signalproducerende system imprægneret heri). Den foretrukne matrix til fremstilling af reagentelementet er nylonmikrofiltreringsmembran, specielt membraner fremstillet ud fra nylon-66 støbt på en kerne af ikke-vævede polyesterfibre. Adskillige nylonmikrofiltreringsmembraner af denne art frembringes kommercielt af Pall Ultrafine Filtration Corporation med en gennemsnittporestørrelse på fra 0,1 til 30 3,0 mikron. Disse materialer udviser mekanisk styrke og 35 fleksibilitet, dimensionsstabilitet, når de udsættes for vand, og hurtig opfugtning.

Mange variationer i den særlige kemiske opbygning af nylon er mulig. Disse omfatter ufunktionaliseret nylon-66 med ladede endegrupper (solgt under handelsnavnet "Ulti-
5 pore" af Pall Ultrafine Filtration Corporation; "Pall"). Positive ladninger dominerer under pH 6, medens negative ladninger dominerer over pH 6. I andre membraner er nylonen funktionaliseret inden membranen er dannet til opnåelse af membraner med forskellige egenskaber. Nylon funktionaliseret med carboxygrupper er negativt ladede over
10 et bredt pH område (forhandlet som "Carboxydyn" af Pall). Nylon kan også være funktionaliseret med en stor tæthed af positivt ladede grupper på dens overflade, typisk kvaternære amingrupper, således at nylonen udviser lille variation i ladning over et bredt pH område (solgt som "Posidyn" af Pall). Sådanne materialer er specielt velegnede til udførsel af den omhandlede fremgangsmåde. Det er også muligt at anvende membraner, der indeholder reaktive funktionelle grupper beregnet til kovalent immobilisering
15 af proteiner (solgt som "Biodyne Immuno Affinity"-membraner af Pall). Disse materialer kan anvendes til kovalent at knytte proteiner f.eks. enzymer anvendt som reagenser. Skønt alle disse materialer er anvendelige bliver nylon med stor tæthed af positivt ladede grupper på overfladen
20 heraf den bedste stabilitet af reagenser, dersom der formuleres til en tør reagenspude. Ufunktionaliseret nylon giver den næstbedste stabilitet med carboxylerede nylonarter som de bedste herefter.

30 Ønskede resultater kan fås med porestørrelser der ligger fra ca. 0,2-2,0 μm , fortrinsvis ca. 0,5-1,2 μm og mere foretrukket ca. 0,8 μm , dersom der anvendes fuldblod.

Udformningen af håndtaget, på hvilket reagenset er
35 samlet, er forholdsvis uden betydning, så længe som håndtaget muliggør tilgang til den ene side af reagenslemen-

tet af prøven og til den anden side af reagenselementet ved indfaldende lys, hvis reflektionskoefficient skal måles. Håndtaget hjælper også til at indføre reagenselementet i det absorptionsmålende udstyr, således at det passer med det optiske system. Et eksempel på et passende håndtag er en mylar eller anden plaststrimmel, hvortil et overførselsklæbemiddel som 3M 365 eller Y9460 overførselsklæbemiddel er påført. Et hul udstandses i plasten gennem overførselsklæbemidlet. Et reagenselement, typisk i form af en tynd pude, der enten indeholder reagenser eller hvortil reagenser senere skal sættes, påføres herefter på håndtaget ved hjælp af overførselsklæbemiddel således at det er fast knyttet til håndtaget i det område, der omgiver hullet, der er udstandset gennem håndtaget og overførselsklæbemidlet. En sådan anordning er vist i fig. 1, der viser reagenspuden 11 fastgjort til et mylarhåndtag 12 ved hjælp af klæbemidlet 13. Hullet 14 muliggør tilførsel af prøven eller indfaldende lys til den ene side af reagenspuden 11, medens adgang til den anden side af reagenspuden er ubegrænset. Alle dimensioner af reagenspuden og håndtaget kan udvælges, således at reagenspuden passer nær ind i det reflektionskoefficient-aflæsende instrument tæt ved en lyskilde og en detektor for reflekteret lys.

25

Dersom en nylonmatrix vælges til dannelse af reagenspuden, når den angivne tykkelse anvendes, foretrækkes det, at reagenspuden er understøttet af en holder på en sådan måde, at ikke mere end 6 mm målt i en hvilken som helst retning er understøttet af holderen på det sted, hvor prøven påføres og lysreflektionskoefficienten måles. Større ikke understøttede arealer har en tendens til at give utilstrækkelig dimensionsstabilitet til membranen, således at målinger af reflektionskoefficienten fra overfladen påvirkes i uheldig retning. Et 5 mm diameter hul 14 i reagenstrimmelen vist i fig. 1 virker udemærket.

Der er ingen specielt begrænsning med hensyn til minimum-diameteren af et sådant hul, skønt diametre på mindst 2 mm foretrækkes af hensyn til fremstillingen, prøvetilførslen og aflæsningen af lysreflektionskoefficienten.

Skønt en række farvestoffer kan anvendes som indikatorer, vil valget afhænge af prøvens art. Det er nødvendigt at udvælge en farve, der har en absorptions ved en bølgelængde, der er forskellig fra bølgelængden, ved hvilken røde blodceller absorberer lys, med fuldblod som prøvemiddel eller andre forurenende bestanddele i den opløsning, der skal analyseres, med andre forsøgsmidler. MBTH-DMAB farvestofkoblingen (3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazonhydrochlorid og 3-dimethylaminobenzoesyre), har, skønt den tidligere er beskrevet som velegnet til farvefrembringning for peroxidasermærker i enzymimmunoassay, aldrig været anvendt i et kommercielt glukosemålede reagens. Denne farvekobling giver større dynamisk område og viser forbedret enzymatisk stabilitet i forhold til traditionelle farver, der anvendes til glukosemåling som f.eks. benzidinderivater. Yderligere er MBTH-DMAB farvekoblingen ikke carcinogen, en egenskab ved de fleste af benzidinderivaterne.

En anden farvekobling, der kan anvendes til måling af glukose, er AAP-CTA (4-aminoantipyren og kromotropsyre) koblingen. Skønt denne kobling ikke giver så bredt et dynamisk område som MBTH-DMAB, er den stabil og velegnet til anvendelse ved udførsel af den omhandlede opfindelse, når der måles glukose. Atter giver AAP-CTA farvekoblingen et udvidet dynamisk område og et større enzymatisk aktivitetsstabilitet end de mere almindeligt anvendte benzidinfarver.

Anvendelsen af MBTH-DMAB koblingen muliggør korrektion af hematocrit og graden af oxygenisering af blodet med en enkel korrektionsfaktor. De mere typisk anvendte benzidinfarver muliggør ikke en sådan korrektion. Farven danner en chromophor, der absorberer ved omtrent 635 nm, men ikke i nogen betydelig grad ved 700 nm. Små variationer i målebølgelængder (\approx ca. 10 nm) er mulige. Ved 700 nm kan både hematocrit og oxygeneringsgraden måles ved at måle blodfarven. Yderligere er lysemitterende dioder (LED) kommercielt tilgængelige for både 635 nm og 700 nm målinger, hvorved masseproduktion af udstyret simplificeres. Ved at anvende den foretrukne membranporestørrelse beskrevet ovenfor og den omhandlede reagensformuleringer kan både hematocrit og oxygeneringstilstanden korrigeres ved at måle ved den enkelte 700 nm bølgelængde.

To yderligere betingelser viste sig at give speciel stabilitet og lang lagringstid for et glukoseoxidase/peroxidasepræparat på en polyamidmatrix. Anvendelsen af en pH i området 3,8 til 5,0, fortrinsvis ca. 3,8 til 4,3, foretrukket ca. 4,0, og anvendelsen af et koncentreret puffersystem for at påføre reagenserne på matrixen. Den mest effektive puffer viste sig at være 10 vægt-% citratpuffer med koncentrationer på fra 5 til 15% som værende effektive. Disse er vægt/rumfang-% af opløsningen, hvori reagenserne påføres matrixen. Andre puffere kan anvendes på samme molære basis. Størst stabilitet opnåedes under anvendelse af et lavt pH, fortrinsvis ca. pH 4, et MBTH-DMAB farvesystem og en høj enzymkoncentration på omtrent 500-1000 enheder/ml påført opløsning.

Når man skal fremstille MBTH-DMAB reagentet og enzymesystemet, der udgør resten af det signalproducerende system, er det ikke nødvendigt at opretholde nøjagtige rumfang og forhold, skønt de nedenfor antydede værdier giver gode

- resultater. Reagenser absorberes let af matrixpuden, dersom glukoseoxidase forefindes i en opløsning på ca. 27-54 rumfang-%, peroxidase forefindes i en koncentration på ca. 2,7-5,4 mg/ml, MBTH findes i en koncentration på ca. 2-8 mg/ml og DMAB findes i en koncentration på ca. 8-16 mg/ml. DMAB-MBTH vægtforholdet holdes fortrinsvis i området (1-4):1, fortrinsvis ca. (1,5-2,5):1 og foretrukket ca. 2:1.
- 10 Den grundliggende fremstillingsmetode for reagenselementet er, når først den er fastlagt, ligetil. Membranen selv er stærk og stabil, specielt dersom en nylonmembran af den foretrukne udførelse vælges. Kun to opløsninger af nødvendige for at påføre reagenset, og disse opløsninger kan let fremstilles og er stabile. Den første indeholder generelt farvekomponenterne og den anden generelt enzymerne. Når man anvender MBTH-DMAB farvekoblingen f.eks. opløses de enkelte farver i et vandigt organisk opløsningsmiddel, typisk en 1:1 blanding af acetonitril og vand. Matrixen dyppes i opløsningen, overskud af væske fjernes ved aftryk på filterpapir, og matrixen tørres herefter, typisk ved 50-60 °C i 10-20 minutter. Matrixen indeholdende farverne dyppes derefter i en vandig opløsning indeholdende enzymerne. Et typisk præparat indeholder peroxidase og glukoseoxidaseenzymerne såvel som en eventuelt udvalgt puffer, konserveringsmidler, stabilisator og lignende. Matrixen aftrykkes herefter for at fjerne overskud af væske og tørres som beskrevet tidligere. En typisk formulering for glukosereagenset er følgende:

Farveopløsning

Bland:

40 mg MBTH
 80 mg DMAB
 5 ml acetonitril og
 5 ml vand

Omrør alle faste bestanddele indtil de er opløst, og udhæld på en glasplade eller anden flad overflade. Dyp et stykke posidynmembran (Pall Co.), aftryk overskydende væske og tør ved 56 0C i 15 minutter.

Enzymopløsning

Bland:

6 ml vand
 10 mg EDTA, dinatriumsalt,
 200 mg Poly Pep, lav viskositet <Sigma'
 0,668 g natriumcitrat
 0,523 g citronsyre
 2,0 ml 6 vægt-% Gantrez AN-139 opløst i vand <GAF'
 30 mg pebberrodsperoxidase, 100 enheder/mg og
 3,0 ml glukoseoxidase, 2000 enheder/ml.

25

Der omrøres indtil al fast materiale er opløst og udhældes på en glasplade eller anden flad overflade. Dyp et stykke af membranen, der forud er imprægneret med farvestof, aftryk overskydende væske og tør ved 56 0C i 15 minutter.

30

Det elektroniske apparat, der anvendes til at foretage reflektionskoefficient aflæsninger, indeholder mindst en lyskilde, en reflekterende lysdetektor, en forstærker, en analog til digitalkonverter, en mikroprocessor med hukommelse og program og et display.

35

Lyskilden består typisk af en lysemitterende diode (LED). Skønt det er muligt at anvende en polychrom lyskilde og en lysdetektor, der er i stand til at måle ved to forskellige bølgelængder, vil et foretrukket apparat indeholde 2 LED kilder eller en enkelt diode, der er i stand til at udsende to distinkte bølgelængder af lys. Kommercielt tilgængelige LED-kilder, der frembringer bølgelængder af lys som beskrevet, og som foretrækkes i forbindelse med den foreliggende opfindelse omfatter en Hewlett Packard HLMP-1340 med et emissionsmaksimum ved 635 nm og Hewlett Packard QEMT-1045 med en snævert emissionsmaksimum ved 700 nm. Kommercielt tilgængelige passende lysdetektorer omfatter en Hammamatsu 5874-18K og Litronix BPX-65.

Skønt andre metoder til optagelse af målinger er mulige, giver følgende metode de ønskede resultater. Aflæsninger optages med fotodetektoren på særlige tidspunkter efter at tidsmålingen er begyndt. 635nm LED er kun tilsluttet under en kort måletid, der begynder omtrent 20 sekunder efter starttiden, således som er angivet ved reflektionskoefficienttilslutning. Hvis denne aflæsning indikerer, at et højt glukoseniveau forefindes i prøven, foretages en 30 sekunds aflæsning og anvendes til slutberegning for at forbedre nøjagtigheden.

Skønt andre metoder til optagelse af målinger er mulige, giver følgende metode de ønskede resultater. Aflæsninger optages med fotodetektoren på særlige tidspunkter efter at tidsmålingen er begyndt. 635 nm LED er kun tilsluttet under en kort måletid, der begynder omtrent 20 sekunder efter starttiden, således som er angivet ved reflektionskoefficienttilslutning. Hvis denne aflæsning indikerer, at et højt glukoseniveau forefindes i prøven, foretages en 30 sekunds aflæsning og anvendes til slutberegning for

at forbedre nøjagtigheden. Typisk høje niveauer antages at begynde ved ca. 250 mg/dl. Baggrunden korrigeres med en 700 nm aflæsning optaget ca. 15 sekunder efter start af måleperioden. Aflæsningen fra fotodetektoren integreres over tidsrummet, hvor den pågældende LED er aktivret, hvilket typisk er mindre end 1 sekund. De ukorrigerede reflektionskoefficientaflæsninger anvendes herefter til beregninger udført af mikroprocessoren efter at signalet er forstærket og omdannet til et digitalsignal. Ad skillige mikroprocessorer kan anvendes til at udføre denne beregning. En AIM65 enkeltkort mikrocomputer fremstillet af Rockwell International har vist sig at være tilfredsstillende.

Den omhandlede fremgangsmåde og apparat muliggør en særdeles simpel målemetode med minimumarbejdsstrin for brugeren. Når man bruger opfindelsen anbringes reagensstrimmelen i detektoren, således at hullet i strimmelen passer nøjagtigt med de optiske dele af detektionssystemet. Aftagelig lukke eller anden låg anbringes over de optiske dele og strimmelen for at beskytte apparatet mod det omgivende lys. Målingerne begyndes herefter ved at trykke på en knap på måleapparatet, der aktiverer mikrocomputeren til at tage en måling af reflekteret lys fra den modsatte reagenspude, betegnet en R_{UV} aflæsning. Herefter fjernes beskyttelsen og en dråbe blod påføres reagenspuden, typisk mens reagenspuden er nøjagtig ud for de optiske dele og aflæsningsanordning. Det foretrækkes, at reagenstrimmelen efterlades tæt ved de optiske dele for at formindske håndtering. Instrumentet er i stand til at føle tilførslen af blod eller anden prøve ved hjælp af en nedgang i reflektionskoefficienten, når prøven går gennem matrixen og det reflekterede lys måles på den modsatte side. Nedgang i reflektionskoefficienten starter en tidsinddeling, der er beskrevet detaljeret andet sted i beskrivelsen. Dette bør genanbringes i løbet af 15 sekunder

for samme prøve, skønt denne tid kan variere afhængig af den type prøve, der måles. Resultater kan typisk aflæses omtrent 30 sekunder efter blodtilførsel, dersom en blodglukoseprøve skal måles, skønt 20 sekunders reaktionstid er mulig for glukoseprøver, der indeholder koncentrationer af glukose på mindre end 250 mg/dl. Dersom andre prøver skal måles, kan passende tider til aflæsning af resultatet variere og kan let bestemmes ud fra egenskaberne af den udvalgte reagens/prøve.

10

En særlig nøjagtig bedømmelse af glukosemængden (eller en hvilken som helst anden analyt, der skal måles) kan foretages under anvendelse af baggrundsstrømmen, dvs. strømmen fra fotodetektoren tilsluttet men intet lys reflekteret fra reagenspuden for at foretage en baggrundskorrektion. Det har vist sig, at over en 2-3 måneders periode forandrer denne værdi sig ikke for et specielt instrument fremstillet ifølge en foretrukken udførelsesform for opfindelsen, og det er muligt at programmere denne baggrunds aflæsning ind i computerhukommelsen som en konstant. Med en lille modifikation af fremgangsmåden kan denne værdi imidlertid måles ved hver analyse for at opnås mere akkurate resultater. Ved den modificerede metode er måleapparatet slået til med låget lukket inden reagensstrimmelen er på plads, og baggrundsstrømmen kan måles. Herefter indføres forsøgsstrimmelen i måleapparatet med låget lukket, og R_{ky} målingen foretages, og proceduren fortsætter som beskrevet tidligere. Med den modificerede fremgangsmåde behøver baggrundsstrømmen ikke at være stabil gennem hele måleapparatets levetid, hvorved der fås mere nøjagtige resultater.

De ubehandlede data nødvendige for at beregne et resultat i glukoseforsøg er en baggrundsstrøm angivet som baggrundsreflektionskoefficient, R_k som beskrevet ovenfor; en aflæsning for den uomsatte forsøgsstrøm, $R_{u,y}$, også som

35

beskrevet ovenfor og en slutmåling. I en foretrukken udførelsesform beskrevet nærmere er slutpunktet ikke specielt stabilt og må præcist tidsbestemmes ud fra den første tilførsel af blod. Imidlertid udfører måleanordningen som beskrevet tidligere denne tidsbestemmelse automatisk. For glukosekoncentrationer under 250 mg/dl opnås et passende stabilt slutpunkt i løbet af 20 sekunder, og en slutreflektionskoefficient R_{20} optages. For glukosekoncentrationer indtil 450 mg/dl er en 30 sekunds reflektionskoefficientaflæsning, R_{30} , passende. Skønt systemet beskrevet heri udviser god differentiering indtil 800 mg/dl glukose, er målingen noget støjende og uakkurat over 450 mg/dl, imidlertid ikke så stor at det forårsager et alvorligt problem. Længere reaktionstider skulle give mere velegnede aflæsninger for højere koncentrationer af glukose.

700 nm reflektionskoefficientaflæsning for den dobbelt bølgelængdemåling tager typisk 15 sekunder (R_{15}). På dette tidspunkt vil blodet fuldstændigt være trukket ind i reagenspuden. Efter 15 sekunders forløb fortsætter farvestofreaktionen med at foregå og hvis på en lille del ved en 700 nm aflæsning. Da farveabsorption ved 700 nm signalet imidlertid er en ulempe, ignoreres aflæsninger efter 15 sekunder i beregningerne.

De ukorrigerede data beskrevet ovenfor anvendes til at beregne parametre proportionalt med glukosekoncentration, der lettere kan visualiseres end reflektionskoefficientmålinger. En logaritmisk transformation af reflektionskoefficient analog med forholdet mellem absorptionsgraden og analytkoncentrationen observeret ved transmissionspektroskopi (Beer's Law) kan eventuelt anvendes. En simplificering af Kubelka-Monks ligninger, der specielt af afledt for reflektionskoefficientspektroskopi, har vist af værdi. I denne udledning er K/S relateret med

analytkoncentrationen, idet K/S er defineret af ligning 1.

$$K/S-t = (1 - R^*t)^2 / (2 \times R^*r) \quad (1)$$

5

R^*t er reflektionsevnen optaget på et specielt sluttidspunkt t og den absorberede fraktion af den indfaldende lysstråle beskrevet af ligning 2, hvor R_L er slutpunktsreflektionskoefficienten, R_{20} eller R_{30} .

10

$$R^*t = (R_L - R_b) / (R_{dry} - R_b) \quad (2)$$

R^*t varierer fra 0 for intet reflekteret lys (R_L) til 1 for totalreflekteret lys (R_{dry}). Anvendelsen af reflektionsevnen i kalkulationerne simplificerer i høj grad udformningen af måleanordningen som en høj stabil kilde, og et detekteringskredsløb bliver unødvendig, da disse komponenter er kontrolleret ved hver R_{dry} og R_b måling.

20 For en enkelt bølgelængdeaflysning kan K/S være beregnet ved 20 sekunder (K/S-20) eller 30 sekunder (K/S-30). Kalibreringskurverne, der relaterer disse parametre med YSI (Yellow Springs Instruments) glukosemålinger kan præcist beskrives af den trediegradsligning angivet i ligning 2.

25

$$YSI = a_0 + a_1 (K/S) + a_2 (K/S)^2 + a_3 (K/S)^3 \quad (3)$$

Koefficienterne for disse polynomier er angivet i tabel 1.

TABEL 1

Koefficienter for trediegradspolynomiers tilpasning til enkelt bølgelængdekalibreringskurver

	K/S-20	K/S-30
5		
a_0	-55,75	-55,25
a_1	0,1632	0,1334
10 a_2	$-5,765 \times 10^{-5}$	$-2,241 \times 10^{-5}$
a_3	$2,58 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-8}$

Den specielle kemiske art, der skal måles i de foretrukne udførelsesformer, er MBTH-DMBA indaminfarven, og den komplekse matrix, der skal analyseres, er fuldblod distribueret på en $0,8 \mu$ Posidynmembran. En oversigtsartikel betegnet "Application of Near Infra Red Spectrophotometry to the Nondestructive Analysis of Foods: A Review of Experimental Results", CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 18(3) 203-30 (1983), beskriver anvendelsen af instrumenter baseret på målingen af en optisk densitetsforskel ΔOD (γ_n, γ_{i1}) hvor OD_{γ_n} er den optiske densitet af bølgelængden svarende til absorptionsmaksimet af en komponent, der skal bestemmes, og $OD_{\gamma_{i1}}$ er den optiske densitet ved en bølgelængde, hvor samme komponent ikke absorberes signifikant.

Algoritmen for dobbeltbølgelængdemåling er naturnødvendig mere kompleks end for enkeltbølgelængdemåling, men er meget mere effektiv. Den første grads korrektion anvendt på 700 nm aflæsningen er en simpelt subtraktion af baggrundsfarven på grund af blod. For at foretage denne korrektion kan et forhold mellem absorbans ved 635 nm og 700 nm på grund af blodfarven bestemmes og bestemmes ved at måle blodprøven med 0 mg/dl glukose over et bredt område af blodfarve. Farveforandringen opbyggedes ved at

varierte hematocrit, og der observeredes forholdsvis lineære forhold. Ud fra disse linier normaliseredes K/S-15 ved 700 nm til opnåelse af ækvivalent med K/S-30 ved 635 nm. Dette forhold er angivet i ligning 4, hvor K/S-15n er den normaliserede K/S-15 ved 700 nm.

$$K/S-15n = (K/S-15 \times 1,54) - 0,133 \quad (4)$$

Bemærk at ækvivalenten af det normaliserede 700 nm signal og 635 nm signal kun er sandt ved 0 glukose. Udtrykkende fra hvorfra kalibreringskurverne afledtes er defineret af ligningerne 5 og 6.

$$K/S-20/15 = (K/S-20) - (K/S-15n) \quad (5)$$

$$K/S-30/15 = (K/S-30) - (K/S-15n) \quad (6)$$

Disse kurver er bedst tilpasset ved hjælp af fjerdegradsligninger lig med ligning 3, hvortil fjerdegradsudtryk i K/S er tilsat. Computertilpasningskoefficienterne for disse ligninger er angivet i tabel 2.

TABEL 2

Koefficienter for fjerdegradspolynomiers tilpasning til enkelt bølgelængdekalibreringskurver

		K/S-20/15	K/S-30/15
30	a_0	-0,1388	1,099
	a_1	0,1064	0,05235
	a_2	$6,259 \times 10^{-5}$	$1,229 \times 10^{-4}$
	a_3	$-6,12 \times 10^{-8}$	$-5,83 \times 10^{-8}$
	a_4	$3,21 \times 10^{-11}$	$1,30 \times 10^{-11}$

35

En andengradskorrektion for at fjerne fejlene på grund af kromatografivirkninger er også blevet udviklet. Lave hematocritprøver har karakteristiske lave 700 nm aflæsninger i forhold til højere hematocritprøver med den samme
5 635 nm aflæsning. Dersom forholdet $(K/S-30)/(K/S-15)$ afsættes mod $K/S-30$ over et bredt område af hematocriter og glukosekoncentrationer, viser den fremkomne linie på kurven grænsen mellem prøver, der udviser kromatografiske
10 virkninger (over kurven) og de der ikke gør dette (under kurven). $K/S-30$ for prøverne over kurven er korrigeret ved at hæve aflæsningen svarende til et punkt på kurven med den samme $(K/S-30)/(K/S-15)$.

De ovenfor nævnte korrektionsfaktorer blev skræddersyet
15 til at passe til et enkelt instrument og et begrænset antal reagenspræparationer. Algoritmen kan optimeres for et enkelt instrument og reagens på samme måde som beskrevet ovenfor.

20 Det omhandlede system formindsker således kort sagt operationerne og tilvejebringer adskillige fordele i forhold til tidligere kendte reflektionskoefficientaflæsningsmetoder. Når der sammenlignes med tidligere metoder til bestemmelse af glukose i blod er der f.eks. adskillige
25 i øjenfaldende fordele. For det første er den mængde prøve, der er nødvendig for at mætte den tynde reagenspude, ringe (typisk 5-10 μ l). For det andet er den nødvendige operationstid der kræves for at påføre prøven på det tynde hydrofile lag og lukke låget (typisk 4-7 sekunder)
30 kort. For det tredje er der ikke nogen samtidig tidsstart nødvendig. For det fjerde kan fuldblod anvendes. Fremgangsmåden kræver ikke nogen adskillelse eller anvendelse af prøver, der ikke indeholder røde blodlegemer, og kan ligeledes anvendes med andre dybtfarvede
35 prøver.

Adskillige ikke nærliggende fordele fremkommer som et resultat ved udførsel af den omhandlede opfindelse på fuld-blod. Normale vandige opløsninger (som blod) vil trænge igennem en hydrofil membran til opnåelse af et væskelag på den modsatte side af membranen, en overflade der derfor ikke er velegnet til reflektionskoefficientmålinger. Det har imidlertid vist sig, at blod, tilsyneladende på grund af den gensidige indvirkning mellem røde blodlegemer og proteiner i blodet med matrixen vil befugte polyamidmatrixen uden at have et overskud af væske der trænger gennem den porøse matrix og griber ind i reflektionskoefficientmålingen på den modsatte side af matrixen.

Yderligere ville man antage at de tynde membraner anvendt i forbindelse med den foreliggende opfindelse, når de var våde, ville transmittere lys og kun tilbagegive et svagt signal til reflektionskoefficientmåleanordningen. Tidligere litteratur har generelt angivet, at reflekterende lag er nødvendig bagved matrixen for at reflektere tilstrækkelig lys. I andre tilfælde er en hvid pude blevet anbragt bag reagenspuden inden farvemålingen. I det foreliggende tilfælde er hverken et reflekterende lag eller en hvid pude nødvendig. Faktisk udføres den omhandlede opfindelse typisk med en lysabsorberende overflade bag reagenselementet, hvor indfaldende lys rammer matrixen. Under anvendelse af en lysabsorberende overflade bag reagenselementet, koblet måling af reflektionskoefficient ved to forskellige bølgelængder, muliggøres at acceptable reflektionskoefficientmålinger kan udføres uden at fjerne overskud af væske fra matrixen, hvorved man fjerner et særlig trin, der typisk er nødvendig i tidligere omtalte metoder.

Opfindelsen er nu beskrevet generelt, idet den beskrives nærmere i efterfølgende eksempler, der kun skal være illustrative.

EKSEMPEL IReproducerbarhed

- 5 Blodprøve fra en mand (JG, hematocrit = 45) anvendtes til optagelse af reproducerbarhedsdata som angivet i tabel 3-5.

TABEL 310 Reproducerbarhed af enkeltbølgelængde MPX system

YSI (mg/dl)	Average (mg/dl)		Standard- afvigelse (mg/dl)		Variations- koefficient %	
	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.
25	23,1	23,0	2,1	2,04	9,1	9,0
55	53,3	53,2	3,19	3,32	6,0	6,3
101	101	101	3,0	3,3	3,0	3,0
326	326,6	327	13,3	9,8	4,1	3,0
501		503		17,1		3,4
690		675		28		4,15
810		813		37		4,5

TABEL 415 Reproducerbarhed af dobbeltbølgelængde MPX system

YSI (mg/dl)	Average (mg/dl)		Standard- afvigelse (mg/dl)		Variations- koefficient %	
	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.	20 sek.	30 sek.
25	25	27	1,34	1,55	5,4	5,7
55	55	57,4	2,58	2,62	4,7	4,6
101	101	101,5	2,55	2,18	2,5	2,1
326	332	330	15,0	7,1	4,5	2,1
501		505		21,3		4,2
690		687		22,8		3,3
810		817		30,4		3,7

TABEL 5

Reproducerbarhed af en 3,0 mm diameter åbning

5	<u>YSI (mg/dl)</u>	% C.V.	
		<u>4,7 mm</u>	<u>3,0 mm</u>
	55-100	4,8	4,9
	300	3,0	5,0
10	600	<u>3,8</u>	<u>5,5</u>
	Gennemsnit	3,9	5,1

Blodet opdeltet i 4 prøver og tilsattes glukose over et område på 25-800 mg/dl. 20 bestemmelser blev optaget for hver glukoseforsøgsniveau med strimler udtaget randomiseret fra en 500 strimmelprøve (fabrikationsnummer FJ4-49B). Resultaterne af denne undersøgelse gav følgende konklusioner:

20 1. Enkelt mod dobbeltbølgelængde:

Den gennemsnitlige variationskoefficient for det 30 sekunders dobbelte resultat var 3,7% mod 4,8% for det 30 sekunders enkelte bølgelængderesultat, en forbedring på 23% over et glukoseområdet på 25-810 mg/dl. Der fandtes en 33% forbedring i variationskoefficient i 25-326 mg/dl området. Her aftog reaktionskoefficient fra 5,4% til 3,6%, en signifikant forbedring inden for det mest anvendte område. Den 20 sekunders dobbelte bølgelængdemåling gav lignende forbedring i variationskoefficient i forhold til den enkelte bølgelængdemåling i 25-325 mg/dl området (tabel 3 og 4).

2. Dobbelt bølgelængde, 20 i forhold til 30 sekundsresultater:

Den gennemsnitlige variationskoefficient for et 20
5 sekunders resultat var i 25-100 mg/dl området er næsten identisk med 30 sekunders aflæsningen, 4,2% i forhold til 4,1%. Imidlertid har ved 326 mg/dl 30 sekunders aflæsningen en variationskoefficient på 2,1% og
10 20 sekunders resultatet i en variationskoefficient på 4,5%. Som det fremgår af K/S-20 responskurven begynder kurven at aftage skarpt over 250 mg/dl. Dette fører til dårlig reproducerbarhed ved glukoseniveauer på mere end 300 for 20 sekunders resultatet. Ud fra denne reproducerbarhed er resultatafskæringen for 20
15 sekunders resultatet et eller andet sted mellem 100 og 326 mg/dl. En afskæring på 250 mg/dl bestemtes senere ud fra resultater af genudvindelsesundersøgelsen angivet i eksempel II.

20 3. Åbningens størrelse:

En mindre blændeåbningsstørrelse 3,0 mm us. 5-0 minutter undersøgte. Det indledende forsøg under anvendelse af en 10-gange hånddyppet skiveprøve viste
25 ikke forbedret variationskoefficienter med 3,0 mm åbning, tilsyndeladende på grund af lettere registrering med de optiske dele i systemet. Dersom imidlertid maskinfremstillede valsemembraner anvendtes var den gennemsnitlige variationskoefficient (tabel 5) på
30 den større åbning på 4,7 mm 3,9% us. en gennemsnitlig variationskoefficient for 3,0 mm åbningen på 5,1%. Denne 30% forøgelse i variationskoefficient skyldtes sandsynligvis den uens overflade af valsemembranprøven som nærmere omtalt nedenfor.

EKSEMPEL IIGenudvindelse:

5 For at sammenligne den omhandlede fremgangsmåde (MPX) i forhold til en typisk tidligere metode, der anvender et Yellow Springs Instrument Model 23A glukose analysator fremstillet af Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio (YSI) undersøgtes blod fra 36 donorer. Do-
10 norerne opdeltes ligeligt mellem kvinder og mænd og lå med hematocritter fra 35 til 55%. Blodprøverne anvendtes i løbet af 30 timer efter opsamling, idet der var tilsat lithiumheparin som antikoagulant. Hver blodprøve opdeltes i prøver og tilsattes glukose til opnåelse af 152 prøver
15 i området 0-700 mg/dl glukose. Hver prøve undersøgtes 2 gange for i alt 304 datapunkter.

Responskurver blev optegnet ud fra disse data, og herefter beregnedes glukoseværdier ud fra den korrekte ligning
20 (tabel 1 og 2). Disse MPX glukoseværdier blev herefter afsat mod YSI værdierne til opnåelse af spredningsdiagrammer.

Sammenligning af MPX systemer: For både 20 sekunders og
25 30 sekunders målingstiderne er der visuelt mere spredning i de enkelte-bølgelængdespredningsdiagrammer end de dobbelt-bølgelængdespredningsdiagrammer. 20 sekunders aflæsningen bliver meget spredt over 250 mg/dl, men 30 sekunders målingen har ikke bred spredning, indtil glukoseniveauet er ≥ 500 mg/dl.
30

Disse spredningsdiagrammer kvantificeredes ved at bestemme afvigelserne fra YSI inden for forskellige glukoseområder. Der opnåedes følgende resultater:

TABEL 6

Nøjagtighed af MPX ud for genudvindingsresultater

5	MPX bølge- længde	Måletid (sek)	S.A. (mg/dl) 0-50	Variationskoefficient for området*		
				50-250	250-450	450-70
	enkelt	20	+/- 5,6	7,2	14,5	-
10	enkelt	30	+/- 6,9	7,1	8,8	10,2
	dobbelt	20	+/- 2,3	5,3	12,8	-
	dobbelt	30	+/- 2,19	5,5	5,8	8,4
15	<u>Bemærkning:</u>	Disse er inden for metoden variationskoefficienter				
20	a.	Det dobbelt bølgelængdesystem gav variationskoefficienter, der lå 30% lavere end det enkelte bølgelængdesystem.				
25	b.	Det enkelte bølgelængdesystem viste fra 0-50 mg/dl en standardafvigelse på +/- 6-7 mg/dl, medens standardafvigelsen for en dobbeltbølgelængdemåling kun var +/- 2,2 mg/dl.				
30	c.	Afskæringen for en 30-sekunders MPX måling er 250 mg/dl. For 50-250 mg/dl området gav både 20- og 30-sekunders målingerne lignende inden for -metoden variationskoefficienter (omtrent 7% for enkeltbølgelængde, 5,5% for dobbeltbølgelængde). Imidlertid mere end fordobler inden for				
35		metoden variationskoefficienterne i 250-450 mg/dl området for 20-sekunders aflæsningen				

til 14,5% for den enkelte og 12,8% for den dobbelte bølgelængde.

- 5 d. 30-sekunders aflæsningen var ikke anvendelig over 450 mg/dl både for den enkelte og den dobbelte bølgelængdemåling (variationskoefficienter på 10,2 og 8,4%).

10 Som konklusion gav to MPX systemer optimal kvantificering inden for 0-450 mg/dl området.

1. MPX 30 dobbelt:

15 Dette dobbelte bølgelængdesystem gav en 30-sekunders målingstid med en 95% konfidensgrænse (defineret som sandsynligheden for en måling er inden for 2 standardafvigelser af YSI) på 11,3% (variationskoefficient) for området fra 50-450 mg/dl (tabel 7) og $\pm 4,4$ mg/dl (standardafvigelse) for 0-50 mg/dl.

20

2. MPX 30/20 dobbelt:

25 Dette dobbelte bølgelængdesystem gav en 20-sekunders målingstid i 0-250 mg/dl området og en 30-sekunders målingstid for 250-450 området. 95% konfidensgrænserne var næsten identiske med MPS 30 dobbeltsystemet (tabel 7), 11,1% (variationskoefficient) for 50-450 mg/dl og $\pm 4,6$ mg/dl (standardafvigelse for 0-50 mg/dl).

30

TABEL 7

35 Sammenligning af 95% konfidensgrænser for MPX, glucoscan plus og accu-chek bG⁺ regensstrimler

	Målings- område mg/dl	MPX enkelt bølgelængde		MPX dobbelt bølgelængde	
		<u>20 sek.</u>	<u>30 sek.</u>	<u>20 sek.</u>	<u>30 sek.</u>
5	0-50	11,2 mg/dl	13,8 mg/dl	4,6 mg/dl	4,4 mg/dl
	50-250	14,4 %	14,2 %	10,6 %	11,0 %
	250-450	-	17,6 %	-	11,6 %
	77-405	GlucoScan Plus (Drexler Clinical)		15,9 %	
10	77-405	Accu-Chek bG (Drexler Clinical)		10,7 %	
	50-450	MPX 20/30 Dual Hybrid		11,1 %	
	50-450	MPX 30 Dual		11,3 %	

* Konfidensgrænserne for MPX var fra YSI.
 15 Konfidensgrænserne for GlucoScan Plus og Accu-Chek bG var fra regressionsligningen i forhold til YSI, der eliminerer skævheder på grund af små forskellige i kalibrering.

EKSEMPEL III

20

Stabilitet:

Det meste af laboratoriearbejdet udført for at optimere stabiliteten blev afsluttet under anvendelse af hånddyp-
 25 pede 0,8 μ posidynmembranskiver. Det særlige farvestof/-enzympræparat var forud fremstillet.

1. Stabilitet ved stuetemperatur:

30

Denne undersøgelse blev udført for at kortlægge eventuelt forandring i responsen af det 0,8 μ posidynmembranreagens lagret ved 18-20 °C over silicageltørremiddel. Efter 2,5 måneders forløb kunne der ikke måles registrerbar forandring ved responsen af en stue-
 35 temperaturprøve i forhold til responsen af en prøve,

der var lagret ved 5 °C. Hvert spredningsdiagram repræsenterede et glukoseområde på 0-450 mg/dl.

2. Stabilitet ved 37 °C:

5

En 37 °C stabilitetsundersøgelse under anvendelse af samme reagens som for stuetemperatursundersøgelsen udførtes. Forskellene i glukoseværdier af reagentet lagret ved 37 °C i forhold til stuetemperatur for strimler anbragt med og uden klæbemiddel afsattes i forhold til tiden. Skønt resultaterne var usikre på grund af den dårlige reproducerbarhed af de håndfremstillede strimler var stabiliteten glimrende for strimlerne, hvad enten de var lastet med eller uden klæbestof.

15

3. Stabilitet ved 56 °C:

Otte 5- til 6-dage stabilitetsundersøgelse udførtes under anvendelse af forskellige præparationer af et lignende præparat på skivemembran (tabel 8). For det lave glukoseforsøgsniveau (80-100 mg/dl) faldt gennemsnitsglukoseværdien ved belastning med 3,4%, idet det højeste fald var 9,55%. Ved høje forsøgsniveauer (280-320 mg/dl) aftog glukoseaflysningen med et gennemsnit på 3,4%, idet det største fald var 10,0%.

25

TABEL 8

30 Stabilitet ved pH = 4,0, 0,8 posidynskivereagensformulering belastet 5-6 dage ved 56 °C.

Prøve nr.	% forskel (56 °C i forhold til stuetemperaturprøver)	
	<u>YSI (80-100 mg/dl)</u>	<u>YSI (280-320 mg/dl)</u>
5		
FJ22B	-6,25	+ 5,4
FJ27A	-4,0	- 5,14
FJ28B	-2,4	- 5,3
FJ30H	-9,55	-10,0
10 FJ31C	+4,43	- 1,24
FJ36	-3,2	- 8,5
FJ48B*	-3,0	0,0
GM48A*	<u>-3,0</u>	<u>- 2,5</u>
15 Gennemsnit af 8	-3,4	- 3,4

* Disse to prøver indeholdt to gange den normale koncentration af enzym og farvestof.

20 En undersøgelse af 56 °C belastningen af denne membran over en 19 dages periode viste ingen afgørende forskel for strimler belastet med eller uden klæbestof. I begge tilfælde var 19 dages nedgangen i glukoseværdien <15% for de laveste forsøgsniveauer (80-100) og 300 mg/dl.

25 En anden 56 °C undersøgelse under anvendelse af hånddyppe 0,8 µ posidynmembraner med to gange den normale koncentration og af enzym og farvestof udførtes. To adskilte præparationer med samme formulering blev foretaget, og 30 stabiliteten målt over en 14 dages periode. Gennemsnitsresultaterne af de to undersøgelser blev nedtegnet. Forandringer fandtes inden for +10% over 14 dages perioden for både det høje og det lave glukoseforsøgsniveau. Disse resultater viser, at denne formulering er særlig 35 stabil.

EKSEMPEL IVPrøvestørrelse:

- 5 Kravene til prøvestørrelse for MPX er angivet i tabel 9.

TABEL 9

Virkning af prøvestørrelse for MPX målinger

10

Prøve størrelse (μ l)	Dobbeltbølgelængde gennemsnit					Enkeltbølgelængde gennemsnit				
	Lav glukose YSI = 56									
3	41	50	39	31	40	31	42	30	19	30
4	44	49	49	49	48	41	45	44	45	44
5	54	48	49	51	50	50	49	458	49	49
10	48	50	47	48	54	54	56	55	54	54
20	49	49	49	50	49	49	57	58	60	58

(μ l)	Lav glukose YSI = 360									
3	301	260	276	286	280	274	232	244	260	252
4	383	378	367	341	367	361	356	342	318	344
3	398	402	382	370	388	378	387	366	351	370
10	364	362	378	368	368	356	358	379	369	366
20	375	370	380	378	376	380	382	389	385	384

15

Rumfangene angivet i tabellen overførtes til reagenspuden angivet på fig. 1 under anvendelse af en mikropipette. Når blod fra et fingerprik overføres til en strimmel kan hele prøve ikke overføres, hvorfor de angivne rumfang ikke repræsenterer hele prøvestørrelse, det er nødvendigt at trykke ud fra fingeren til analyse. En 3 μ l prøve er det minimale der er nødvendigt for fuldstændigt at dække reagenspudecirklen. Dette giver ikke nok prøve til fuld-

20

stændigt at mætte reagenspuden og MPX giver lave resultater. En 4 µl prøve mætter knapt nok reagenspuden, medens en 5 µl klart er tilstrækkelig. En 10 µl prøve er en stor skillende dråbe og en 20 µl prøve er en meget stor dråbe og skal sandsynligvis kun anvendes, dersom blod fra en pipette anvendes til prøveudtagning.

Ved lave glukosekoncentrationer har det enkelte bølgelængderesultat nogen afhængighed af prøvestørrelsen, der er fuldstændig fjernet under anvendelse af den dobbelt bølgelængdemåling. Skønt denne afhængighed af enkeltbølgelængden kan betragtes som acceptabel, er den klart utilfredsstillende.

15 EKSEMPEL V

Reproducerbarhed:

Forsøgsmålinger beskrevet oven for blev altid udført flere gange, sædvanligvis 2, 3 eller 4 bestemmelser pr. datapunkt. Disse opstillinger har altid vist klar overensstemmelse selv for prøver med ekstreme hematocriter eller ekstreme oxigenniveauer. Variationskoefficienterne var god og vel under 5%. Det ses derfor, at reproducerbarheden er særdeles god til excellent.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer mange fordele i forhold til de systemer, der hidtil har været kommercielt tilgængelige eller som er blevet beskrevet i litteraturen. Forsøgsmetoderne er enkle og kræver kun ringe teknisk erfaring og er forholdsvis uden operatørfejl. Forsøgene kan udføres hurtigt og under anvendelsen af billige og forholdsvis harmløse reagenser, hvilket er vigtige betingelser for materialer, der skal anvendes i hjemmet. Brugeren opnår resultater, der kan forstås og anvendes i forbindelse med vedligeholdelsesterapi. Herudover har

reagenserne lang levetid, således at de opnåede resultater er pålidelige inden for lange tidsperioder. Udstyret er enkelte og pålideligt og i det væsentlige automatisk.

- 5 Alle patenter og andre artikler nævnt specielt i foreliggende beskrivelse angiver niveauet for fagmanden, og der henvises herved til disse.

10 Det er klart for fagmanden at der kan foretages forandringer uden at gå uden for den foreliggende opfindelses rammer.

P a t e n t k r a v :

5

1. Reagensteststrimmel til anvendelse i et apparat til bestemmelse af en fuldblodprøves blodglukosekoncentration, hvor apparatet omfatter optiske midler til
10 detektering af lysintensitet ved bølgelængder på ca. 635 nm og ca. 700 nm reflekteret fra i det mindste en del af strimlen ved at aflæse reflektansen af i det mindste en del af strimlen k e n d e t e g n e t ved, at; strimlen har en porøs del anbragt nær en distal ende af strimlen,
15 således at den porøse del generelt ved hjælp af apparatets optiske midler registrerer, når strimlen er fastholdt under bestemmelse af blodglukosekoncentrationen, idet den porøse del har en prøveoptagende overflade til at optage en prøve fuldblod og en test-
20 overflade, hvorhos den porøse del yderligere omfatter reagensmidler til angivelse af koncentrationen af blodglukose i prøven af fuldblod i tilstedeværelse af optisk synligt hæmoglobin ved at frembringe en ændring i reflektans på testoverfladen til et forudbestemt tidspunkt, der
25 er en indikation på den glukosekoncentration, der forefindes i prøven, idet reagensmidlerne omfatter kemiske reagenser udvalgt til at frembringe ændringen, der er afhængig af glukosekoncentrationen, idet de kemiske reagenser omfatter en farveprecursor, der danner en kromofor
30 som en indikation på den glukosekoncentration, der forefindes i prøven, idet kromoforen absorberer lys ved ca. 635 nm, men ikke i nogen signifikant grad ved ca. 700 nm.

2. Strimmel ifølge krav 1, hvor farveprecursoren omfatter 3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazolhydrochlorid og 3-dimethylaminbenzoesyre.

5

3. Strimmel ifølge krav 2, hvor de kemiske reagenser er ved en pH-værdi på 3,8 til 5.

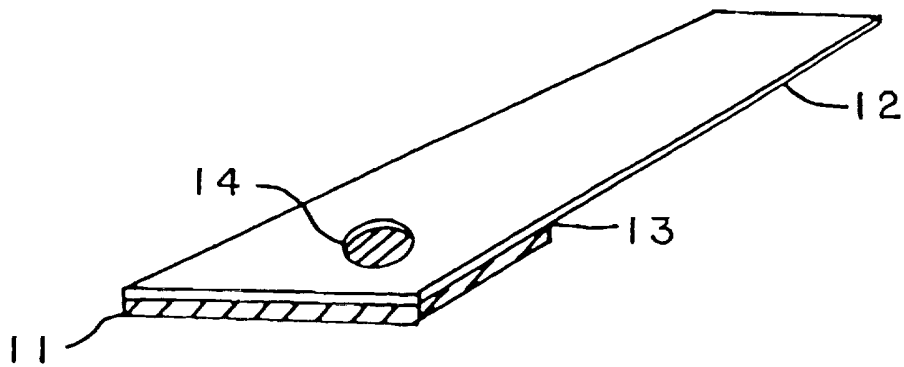


FIG. 1

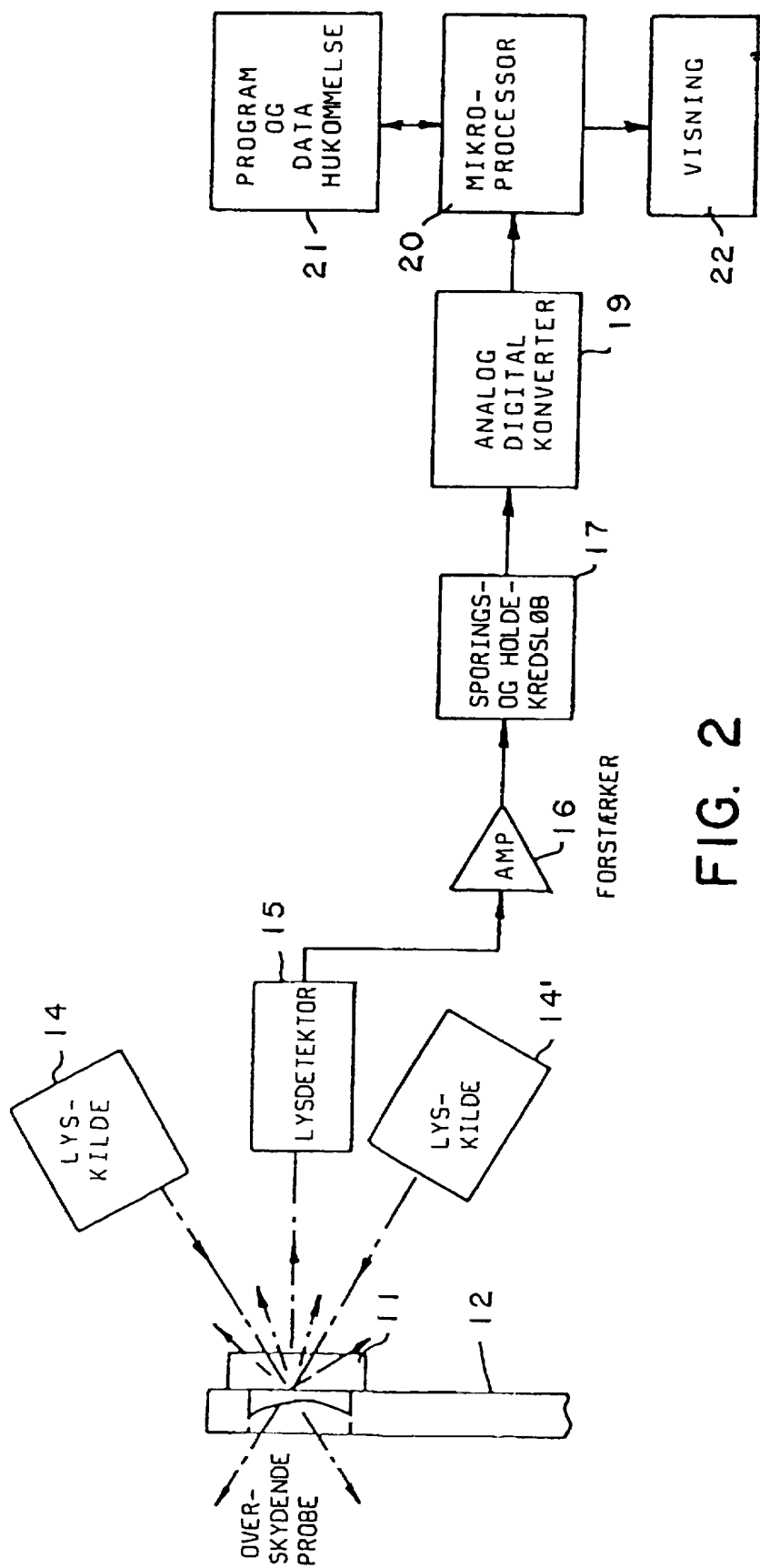


FIG. 2

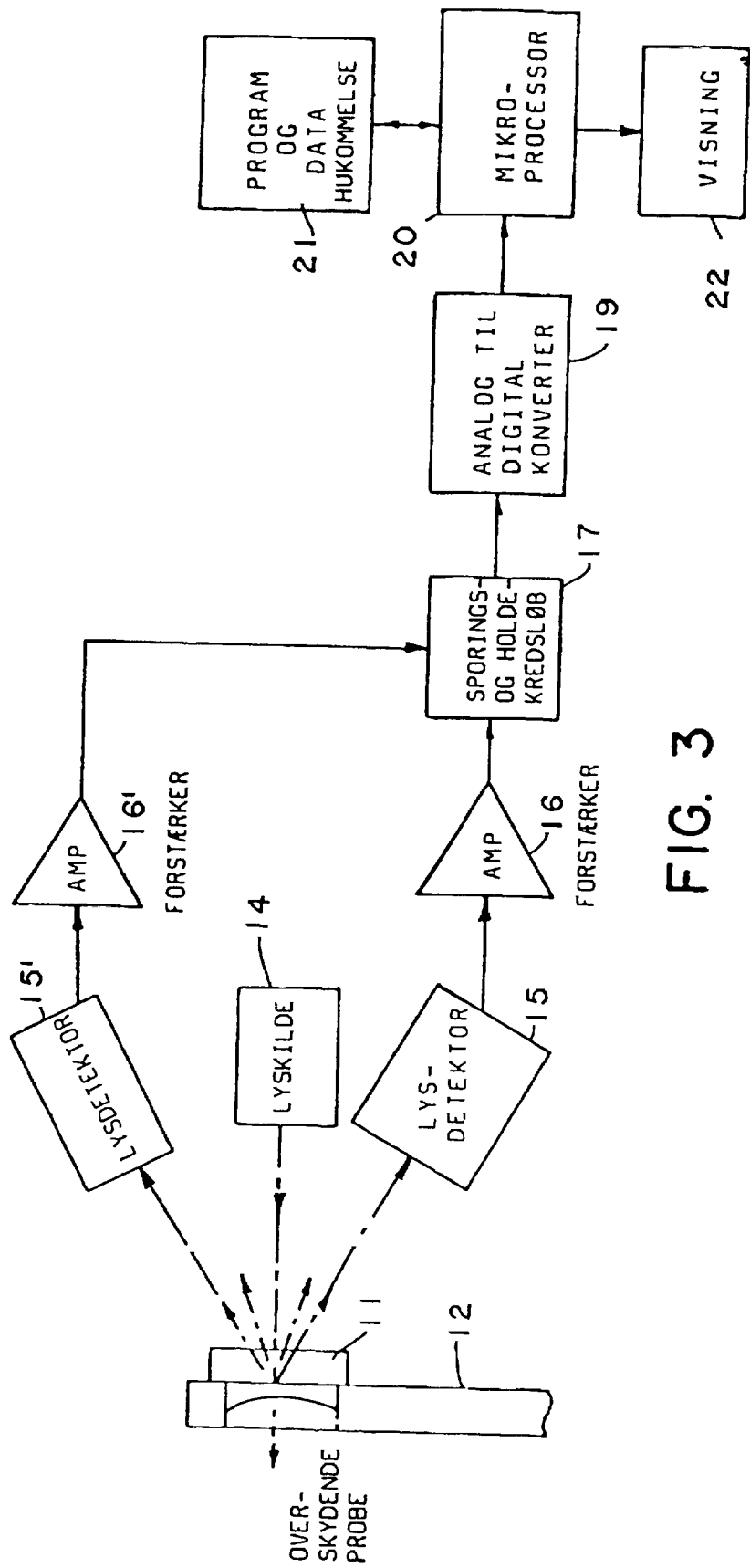


FIG. 3