

Andrzej CHWOJNOWSKI<sup>1</sup>, Ewa ŁUKOWSKA<sup>1</sup>, Konrad DUDZIŃSKI<sup>1</sup>

## WYKORZYSTANIE MEMBRAN PÓLPRZEPUSZCZALNYCH W SUCHYCH TESTACH

**Streszczenie.** W artykule tym przedstawione zostały sposoby wykorzystywania membran półprzepuszczalnych w różnych typach suchych testów. Pokazano przykłady testów do pełnej krwi. W zależności od analizowanego roztworu i zastosowanej techniki oznaczeń pokazane zostały różne sposoby wykorzystania membran.

## APPLICATION OF SEMIPERMEABLE MEMBRANES IN DRY TESTS

**Summary.** Different applications of semipermeable membranes in dry tests were shown in these papers. The examples of dry tests for whole blood described. Various methods of membranes application were shown in different technique of analysis in tests.

### 1. Wprowadzenie

Analizy laboratoryjne stanowią jeden z podstawowych elementów decyzyjnych w wielu dziedzinach życia. Szczególnie istotną rolę pełnią w diagnostyce medycznej i to zarówno w diagnostyce szpitalnej, jak również ambulatoryjnej. Trudno również wyobrazić sobie podjęcie decyzji, bez przeprowadzenia analiz, w takich dziedzinach, jak chemia, ochrona środowiska, biologia, technologia spożywcza i wiele innych. Powszechna konieczność wykonywania analiz oraz często wysoki koszt jednostkowy spowodowały, że stały się one istotnym czynnikiem kosztowym [1, 2]. Z drugiej strony coraz częściej pojawia się konieczność wykonywania analiz przez osoby nie posiadające kwalifikacji do ich wykonywania. Przykładem może tu być zatroskany rodzic, który chce sprawdzić mocz swojego dziecka, czy nie znajdzie tam narkotyków. Wreszcie pewne analizy powinny być możliwe do wykonania przez każdego

---

<sup>1</sup> Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN, ul. Trojdena 4, 02-109 Warszawa, e-mail: achwoj@ibib.waw.pl

zainteresowanego – tu najbardziej spektakularnym przykładem jest konieczność samodzielnego oznaczania poziomu glukozy we krwi przez wcale pokaźną grupę diabetyków [3].

Wszystkie te czynniki zdecydowały o szybkim rozwoju suchych testów jako szeroko dostępnej metody analitycznej. Suche testy są stosunkowo tanie, bo koszt jednostkowy analizy waha się od 0,2 do 25 złotych w zależności od oznaczanego parametru i metody pomiaru. Najczęściej wykonanie analizy za pomocą suchego testu nie wymaga żadnego dodatkowego oprzyrządowania, a sama analiza może być wykonana w domu lub pod przysłowiowym krzaczkiem. W wielu wypadkach również sam odczyt jest niezwykle prosty, bo ogranicza się do porównania pola testowego ze skalą barw, lub odczytu za pomocą przenośnego aparaciku o wielkości pióra wiecznego czy paczki papierosów. Są również znacznie większe automatyczne uniwersalne czytniki pozwalające na odczyt kilkudziesięciu rodzajów testów danej firmy. Łatwość użycia, niska pracochłonność, mały koszt, dostępność, a w wypadku niektórych testów, możliwość ich wykorzystywania w autokontroli pacjentów spowodowały ogromną popularność suchych testów w zastosowaniach medycznych [4-6], a także w ochronie środowiska [1, 2].

## 2. Problemy separacyjne

Suche testy stosuje się często do analiz w mediach, które z powodzeniem maskują wszelkie reakcje barwne. Przykładami może być tu pełna krew, soki i przeciery owocowe, wodne zawiesiny organiczne i nieorganiczne z cieków naturalnych czy wód powodziowych oraz ścieków, a nawet wody z zanieczyszczone olejami czy emulsjami tłuszczowymi. Praktycznie każdy z tych przykładów wymaga oddzielnego podejścia do problemu.

Membrany do suchych testów mają kilka wspólnych cech wymuszanych techniką samego testu. W suchych testach jedyną siłą napędzającą proces filtracji jest osmoza. To powoduje konieczność stosowania membran jak najcieńszych, o jak największej ilości porów, oczywiście przy zachowaniu odpowiednich średnic porów. Natomiast w odróżnieniu od typowych zastosowań membran w przypadku suchych testów nie musi odznaczać się dużą wytrzymałością mechaniczną, ponieważ nie jest narażona na działanie istotnych sił, a dodatkowo zawsze związana jest z jakąś formą nośnika, bądź innego mechanicznego zabezpieczenia. Wszystkie te membrany używane w suchych testach są z założenia jednorazowego użytku. Powierzchnia membrany wykorzystywanej w jednym teście waha się od około 25 mm<sup>2</sup> do kilku cm<sup>2</sup>. Są to membrany prawie wyłącznie płaskie, choć czasami dodatkowo formowane są w specjalny sposób. Ponieważ membrana jest jednorazowa, to w niektórych rozwiązaniach (np. membrany pęczniące) porofor jest zawarty w strukturze membrany i dopiero podlega wypłukaniu w czasie samej analizy. Dodatkowo w niektórych typach testów membrana półprzepuszczalna

poza rolę separacyjną spełnia również rolę transportową, kontaktu elektrycznego, granicy faz ciec-z-gaz i separatora gazu.

Jednym z najpoważniejszych wyzwań jest pełna krew. Wykonanie analizy składników zawartych w pełnej krwi powodowało konieczność odseparowania zarówno erytrocytów, jak i innych upostaciowionych składników krwi, jak leukocyty, płytki krwi itd. Nie stanowiłoby to teoretycznie problemu, gdyby nie dość szczególnie właściwości krwi, a przede wszystkim jej zdolność krzepnięcia. Powstanie skrzepu praktycznie wyklucza filtrację, a skrzep powstaje najszybciej na chropowatych rozwiniętych powierzchniach, takich jak typowe membrany. W innych przypadkach stosowania procesów membranowych (hemodializa, plazmafereza) dodaje się heparynę (antykoagulant). W przypadku suchych testów jest to niemożliwe, ponieważ nie udaje się w sposób trwały immobilizować heparyny na powierzchni membran w suchych testach. Również nieskuteczne okazuje się stosowanie antykoagulantów w fazie stałej, ponieważ nie spełniają one swojego zadania. Dlatego konieczne jest opracowanie takiej błony, aby w czasie koniecznym do wykonania analizy tzn. 0,5-3 minut na powierzchni membrany nie powstał skrzep. Tam gdzie jest to niemożliwe lub nieopłacalne, trzeba rezygnować z analizy z pełnej krwi na korzyść analizy z plazmy.

Jest kilka podstawowych problemów, z którymi spotyka się każdy, kto zamierza zastosować membrany w technice suchych testów. Pierwszym problemem jest odporność membrany na wysuszenie i przechowywanie w środowisku o minimalnej wilgotności utrzymywanej przez sorbenty wilgoci, np. sita molekularne. Dalej niezbędna jest odporność chemiczna membrany na zestaw odczynników zawarty w polu testowym, a czasami na roztwór analitu. Często powtarzającym się problemem jest jakość separacji, a głównie przepuszczanie niskocząsteczkowych barwników. Kolejną grupą problemów są sposoby wiązania membrany z polem testowym oraz moment, w którym to wiązanie jest technicznie wykonywane. Również niezwykle istotnym problemem jest dylemat, czy pokryć membraną gotowy test, czy test wykonywać w oparciu o gotową membranę. No i wreszcie pytanie, czy może zrobić membranę reaktywną z zawieszonym kompletem odczynników. Na żadne z tych pytań nie ma jednej odpowiedzi i w chwili obecnej właściwie uniwersalnej recepty.

Dlatego też, chociaż powstała taka różnorodność praktycznych rozwiązań problemów separacji na powierzchni suchych testów, to w dalszym ciągu trwają prace nad znalezieniem jak najlepszych rozwiązań dla różnych problemów analitycznych. Większość przypadków niestety stanowią rozwiązania jednostkowe, których nie da się przenieść nie tylko na inny roztwór, ale nawet na ten sam typ roztworu, lecz inny analit.

### 3. Suche testy wykorzystujące membrany

Największe zainteresowanie membranami półprzepuszczalnymi w technice suchych testów ogniskowało się na analizach krwi, a w szczególności oznaczaniu glukozy we krwi. Wiąże się to zarówno ze skalą problemu (miliony diabetyków), jak i z potencjalnymi zyskami.

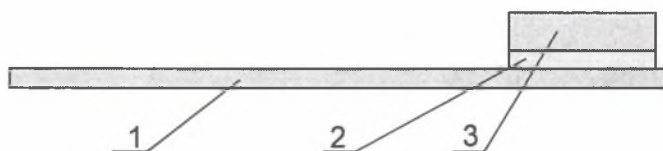
Pierwsze testy do analizy w pełnej krwi miały celulozowe pole testowe pokryte membraną półprzepuszczalną [7,8], z której po określonym czasie spłukiwało się wodą krew i odczytywało wynik analizy najpierw przez porównanie ze skalą barw, a następnie reflektometrycznie.



Rys. 1. Test do pełnej krwi: 1) błona półprzepuszczalna separująca erytrocyty i przy okazji inne upostaciowione składniki krwi, 2) warstwa reakcyjna np. bibuła nasycona zestawem odczynników, 3) warstwa łącząca, 4) nośnik

Fig. 1. Test for whole blood: 1) semipermeable membrane for erythrocytes and other blood particles separations, 2) reaction layer saturated by reactants, 3) binding layer, 4) carrier

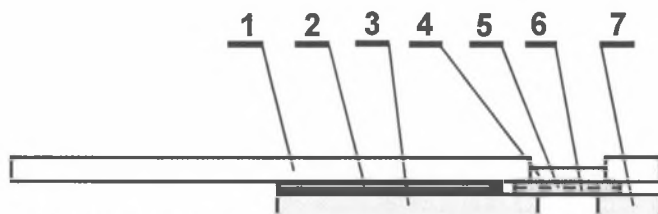
Drugim, równie popularnym, rozwiązaniem jest test, w którym cały zestaw odczynników jest zawieszony w błonie półprzepuszczalnej separującej erytrocyty na swojej powierzchni. W takiej błonie często zawieszony jest również i porofor [9, 10]. Błona ta może być błoną pęczniącą [11]. Z tego typu błon krew również była spłukiwana lub ścierana wilgotnym wacikiem. Trzeba wyraźnie zaznaczyć, że powierzchnia testu z zawieszonymi wewnątrz membrany odczynnikami jest bardziej wytrzymała mechanicznie od kilkumikronowej membranki położonej na bibule. Membrana testu z reagentami zawieszonymi w membranie półprzepuszczalnej może być zbudowana z kilku warstw nakładanych kolejno na powierzchnię nośnika, dając w rezultacie membranę wielowarstwową [12].



Rys. 2. Test do pełnej krwi z reagentami zawieszonymi w membranie półprzepuszczalnej: 1) nośnik, 2) warstwa łącząca, 3) membrana półprzepuszczalna z zawieszonymi odczynnikami

Fig. 2. Test for whole blood with reactants in semipermeable membrane: 1) carrier, 2) binding layer, 3) semipermeable membrane with reactants

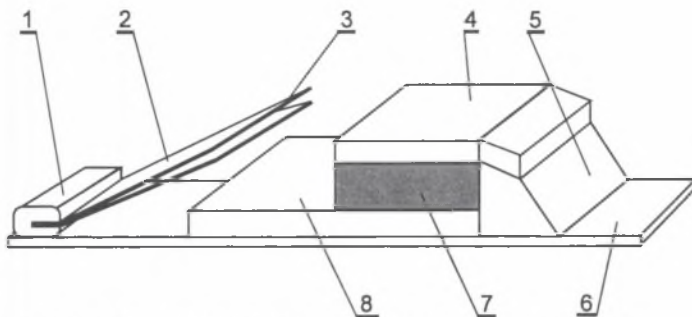
Następną wersją testów przystosowanych do odczytu bez usuwania krwi z ich powierzchni są testy, w których krew nanosi się na pole testowe (od góry), a odczytu dokonuje się ze strony przeciwnej (od spodu). Test taki może mieć pole testowe składające się z jednej warstwy z kompletem odczynników zawieszonych w membranie [13] lub z kilku warstw (rys.3) [14].



Rys. 3. Test do oznaczania glukozy-schemat: 1) nośnik, 2) konstrukcyjna warstwa dystansowa, 3) nośnik dolny, 4) siatka w „okienku” do nanoszenia krwi, 5) warstwa filtrująca, 6) warstwa reakcyjna, 7) nośnik

Fig. 3. Test for glucose determination - scheme: 1) carrier 2) construction distance layer, 3) lower carrier, 4) mesh in "window" for blood, 5) filtration layer, 6) reaction layer, 7) carrier

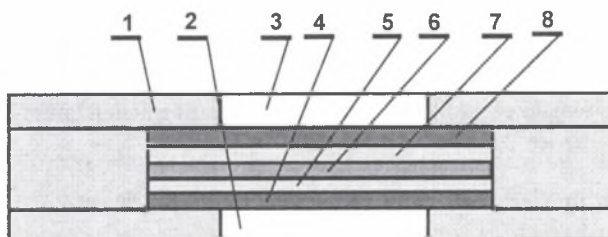
Kolejnym bardzo ciekawym rozwiązaniem konstrukcyjnym jest filtracja krwi przez membranę szklaną, która jednocześnie pełni rolę transportową dostarczając osocze zawierające analit (tu potas) do strefy reakcyjnej [15] (rys. 4).



Rys. 4. Schematyczna budowa testu do pełnej krwi: 1) mocowanie, 2) przezroczysta folia, przez którą wykonywany jest odczyt reflektancji, 3) włóknina z kompozycją odczynnikową stanowiąca właściwe pole testowe, 4) pole do nanoszenia krwi, 5) mocowanie, 6) nośnik, 7) warstwa filtrująca, 8) warstwa transportująca roztwór substancji oznaczanej

Fig. 4. Schema of test construction: 1) binding, 2) transparent film for reflectance reading, 3) mesh with reagents –suitable reaction field, 4) field for blood application, 5) binding, 6) carrier, 7) filtration layer, 8) layer for analyte transport

Poza separacją cząstek w suchych testach wykorzystuje się membrany do separacji faz. W pokazanym na rys. 5 przykładzie amoniak powstający w wyniku enzymatycznej hydrolizy mocznika, w buforowanej, alkalicznej warstwie reakcyjnej przedostaje się przez membranę półprzepuszczalną do warstwy wskaźnikowej, która w wyniku alkalizacji spowodowanej sorpcją mocznika zmienia kolor [16].



Rys. 5. Test oznaczania mocznika: 1) obudowa, 2) otwór do odczytu reflektancyjnego, 3) otwór na próbkę, 4) nośnik z przezroczystego tworzywa, 5) warstwa wskaźnikowa, 6) warstwa półprzepuszczalna, 7) warstwa reakcyjna, 8) warstwa rozpraszająca światło

Fig. 5. Test for urea determination: 1) casing, 2) hole for reflectance reading, 3) hole for sample, 4) transparent carrier, 5) indicator layer, 6) semipermeable membrane, 7) reaction layer, 8) light spreading layer

Wszystkie podane powyżej przykłady dotyczą medycyny, ale sama zasada zaprezentowana na rysunkach 1 i 3 jest wykorzystywana wszędzie tam, gdzie prowadzi się analizę z zawiesiny. Mogą być to zarówno przeciery spożywcze, jak i najróżniejsze zawiesiny wodne czy olejowo-wodne. Wybór, czy odczyt ma być dokonany z tej samej strony, co naniesiona próbka, czy z przeciwej, zależy już od konkretnego rozwiązywanego problemu.

#### 4. Perspektywy wykorzystania membran w suchych testach

Na pewno jeszcze długo najistotniejszą rolę w wykorzystaniu membran w suchych testach będzie pełniła analiza krwi, w tym na pewno analiza leków w ramach terapeutycznego monitoringu. Ale obecnie coraz większy nacisk kładzie się na wykorzystanie szybkich technik analitycznych w innych dziedzinach, a szczególnie w technologii żywności, biologii i ochronie środowiska. W żywności chodzi tu przede wszystkim o oznaczanie witaminy C i zanieczyszczenia chemiczne (np.  $\text{NO}_2^-$ , metale ciężkie) i bakteryjne. W biologii to oznaczanie bakterii, wirusów i ich metabolitów. A w ochronie środowiska to przede wszystkim oznaczanie zanieczyszczeń i to zarówno jakościowe, jak i ilościowe. We wszystkich tych testach membrany są albo użyteczne, albo niezbędne.

#### Literatura

1. Chwojnowski A.: Suche testy do szybkiej diagnostyki medycznej i dla ochrony środowiska Monografia „Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000”, Tom III Biopomiary; Akademicka oficyna wydawnicza EXIT Warszawa 2001, str. 671-684.
2. Chwojnowski A.: Suche testy kolorymetryczne dla medycyny, biologii i chemii. Prace IBIB Vol. 53, Warszawa 1999.
3. Walford S., Clarke P., Paisey R. et al.: Home blood - glucose measurements without reflectance meter. *Lancet* 24 (1980) 653-654.
4. Sonntag O.: Dry chemistry. Analysis with carrier bound reagents. - Elsevier; Amsterdam, London, New York, Tokio 1993.
5. Walter B.: Dry reagent chemistries in clinical analysis. - *Anal. Chem.* 55 (1983) 498A-514A
6. Libeer J.C.: Solid phase chemistry in clinical laboratory tests: a literature review. - [Review] *J. Clin. Chem. Biochem.* 23 (1985) 645-655.
7. Adams E.C., Smeby R.R.: Diagnostic test device for blood sugar. - US Patent nr. 3,092,465 Jun. 4, 1963.

8. Chwojnowski A., Ziółkowska A.: Selected aspect of the evaluation and selection of dry tests for glucose and urea determination in blood - *Biocyb. and Biomed. Eng.* 20/2 (2000) 111-123.
9. Hildenbrand K., Dhren H., Perrey H., Wehling K.: Transparentes Teststreifen- system. - DB Patent nr. 3540526 z 27. 05. 1987.
10. Okaniwa K., Koyama M., Kikugawa S.: Analytical element. - US Patent nr. 4,427,631 Jan. 24, 1984.
11. Chwojnowski A., Ziółkowska A.: Pasek probierczy do wykrywania substancji zawartych w płynach. - PL Patent 52316 Y1 1994.
12. Columbus R. L., Palmer H. J.: "Architextured" fluid Management of biological Liquids. - *Clin. Chem.* 33 (1987) 1531-1537.
13. Roche - Informacja techniczna 1993.
14. Adams E.C., Smeby R.R.: Diagnostic test device for blood sugar. - US Patent nr. 3,092,465 Jun. 4, 1963.
15. Vogel P., Rittersdorf W., Thym D., Bartl K.: Development of a potassium assay on the Reflotron. - *Clin. Chem.*, 36 (1990) 1070.
16. Curme H.G., Columbus R.L., Dappen T.W. et al.: Multilayer film elements for clinical analysis: General concepts - *Clin. Chem.*, 24 (1978) 1335-1342.

## Abstract

The separations problems in dry test technique were discussed. Application of the semipermeable membranes in tests, including following questions: chemical resistance on reagents in the test field, chemical resistance on analyte solutions, resistance on conditions of storage in very low humidity, quality binding of membranes with base of test field and methods of binding membrane with test field. Especially gave attention to problems on the membrane-blood contact, because the erythrocytes separation from whole blood have been one of greatest problem in dry tests. The examples of applications of semipermeable membranes in dry tests for analysis of glucose in whole blood were shown in the fig.1-4 with descriptions of tests construction. The example of phase separation in the test for urea determination in plasma was show in the fig.5. The forecast utilizations of semipermeable membranes in dry test in future will take place mainly in tests for whole blood (medical), in tests for food analysis and in tests for environmental study and protection.