



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103353473 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 16

(21) 申请号 201310247089. 7

(22) 申请日 2009. 03. 25

(30) 优先权数据

12/056, 473 2008. 03. 27 US

(62) 分案原申请数据

200980120249. 3 2009. 03. 25

(71) 申请人 霍夫曼—拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 C. D. 威尔西 M. 戈沙尔 H. 韦德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 权陆军

(51) Int. Cl.

G01N 27/26 (2006. 01)

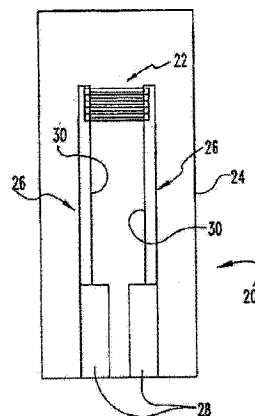
权利要求书5页 说明书28页 附图5页

(54) 发明名称

具有改进的分析物特异性的生物传感器

(57) 摘要

本发明涉及具有改进的分析物特异性的生物传感器。用于测定生物体液中的分析物浓度的化学基质包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、烷基吩嗪季盐和 / 或亚硝基苯胺。将化学基质与电化学生物传感器一起使用, 以在生物传感器内发生反应后测定分析物的浓度, 在反应完成之时可测定浓度。本发明描述的另一个方面是使用葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、烷基吩嗪季盐和亚硝基苯胺的化学基质来测定分析物浓度的方法。所述方法的特征另还在于测试时间为 5 秒钟或更少。使用新的化学基质的方法可容易地在约 6.5 ~ 约 8.5 的 pH 下, 测定浓度为约 20~600mg/dL 的分析物, 例如血液葡萄糖。

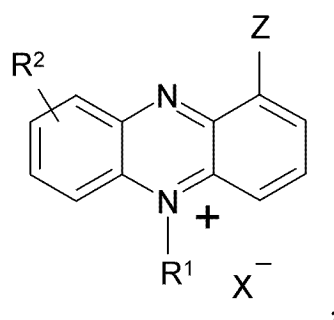


1. 具有降低的来自与分析物一起存在的其他组成成分干扰的用于测定液体样品中的分析物浓度的方法,所述方法包括使分析物与包含葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和 5-烷基吩嗪季盐的基质反应以提供电活性剂,其中所述基质在约 6.5-约 8.5 的 pH 是稳定的且是光化学上稳定的,测量由电活性剂产生的电化学反应,根据所测量的电化学反应测定液体样品中分析物的浓度。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述分析物是葡萄糖,且所述样品含有约 20mg/dL ~ 约 600mg/dL 的血液葡萄糖。

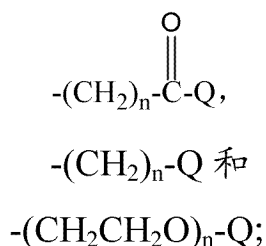
3. 权利要求 1 的方法,其中所述基质的 pH 为约 6.5 ~ 约 8.5。

4. 权利要求 1 的方法,所述方法包括将样品涂在具有包括基质的试验带的生物传感器的应用区域,和使所述浓度显示在构造成能与所述生物传感器一起使用的监测装置的显示器上,其中所述 5-烷基吩嗪季盐具有下式:



其中 Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NHAc$ 和 $-OY$,

其中 m 是 0 ~ 约 6 范围内的整数, Y 选自

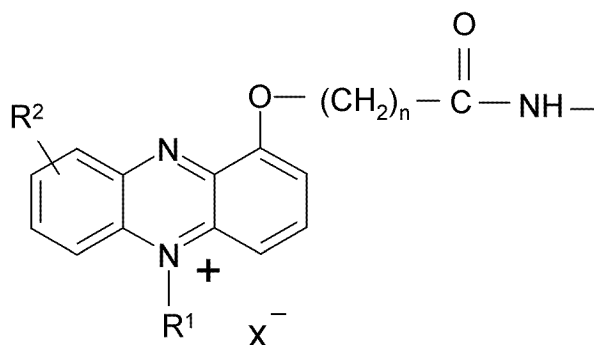


其中

n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数;

Q 为 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6OH$ 、 $-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_6G$ 、 $-(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-(OCH_2CH_2)_6NR^2R^3$ 和 $-(OCH_2CH_2)_6OH$;

且 G 为 $-COOH$ 、 NR^2R^3 或



;

R^1 为 C_1-C_6 烷基,

R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基,

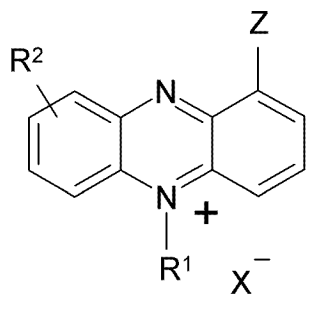
$\circ$ 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数 ; 和

X 为选自以下的阴离子 : 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$ 。

5. 权利要求 4 的方法, 其中可对具有范围为约 20 ~ 约 600mg/dL 的血液葡萄糖水平的所述样品进行所述测定。

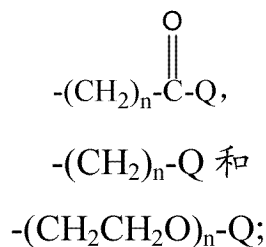
6. 权利要求 4 的方法, 其中所述显示发生在涂抹所述样品后约 5 秒钟或更少。

7. 权利要求 1 的方法, 其中 5- 烷基吩嗪季盐具有下式 :



其中 Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NHAc$ 和 $-OY$,

其中 m 是 0 ~ 约 6 范围内的整数, Y 选自

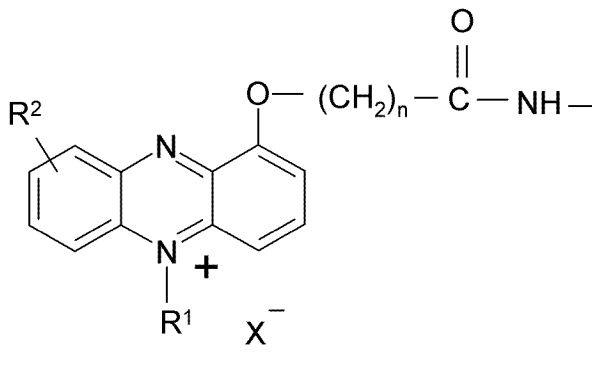


其中

n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数 ;

Q 为 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6OH$ 、 $-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_6-G$ 、 $-(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-OCH_2CH_2)_6NR^2R^3$ 和 $-(OCH_2CH_2)_6OH$;

且 G 为 $-COOH$ 、 NR^2R^3 或



R^1 为 C_1-C_6 烷基,

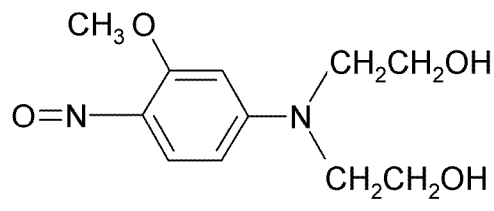
R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基,

o 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数 ; 和

X 为选自以下的阴离子 : 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $\text{CH}_3\text{OSO}_2^-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OSO}_2^-$ 和 CH_3SO_3^- 。

8. 权利要求 7 的方法, 其中 R^1 为 C_2H_5 。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述亚硝基苯胺具有下式 :



10. 权利要求 9 的方法, 其中 Z 是 $-\text{OY}$; Y 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{COOQ}$; Q 是 OH; 且 $n = 3$ 。

11. 权利要求 9 的方法, 其中 Z 是 $-\text{OY}$; Y 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{COOQ}$; Q 是 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_o-\text{G}$; G 是 $-\text{COOH}$; 且 o 是 4。

12. 权利要求 9 的方法, 其中 Z 是 $-\text{OY}$; Y 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$; Q 是 $-\text{NH}_2$ 且 n 是 4。

13. 权利要求 9 的方法, 其中 Z 是 $-\text{OY}$; Y 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$; Q 是 $-\text{OH}$ 且 n 是 3。

14. 权利要求 9 的方法, 其中 Z 是 $-\text{OY}$; Y 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$; Q 是 $-\text{OR}^2$; R^2 是 Me; 且 n 是 4。

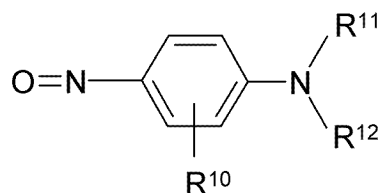
15. 权利要求 9 的方法, 其中 Z 是 $-(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ 且 m 是 1。

16. 权利要求 9 的方法, 其中 Z 是 $-\text{NHAc}$ 。

17. 权利要求 7 的方法, 其中所述 5- 烷基吩嗪季盐是 5- 乙基吩嗪盐。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述 5- 乙基吩嗪盐是 1-(3- 羧基丙氧基)-5- 乙基吩嗪。

19. 权利要求 1 的方法, 其中所述亚硝基苯胺为具有下式的化合物 :



且

R^{10} 表示氢、卤素、烷氧基或烷硫基,

R^{11} 表示烷基或羟烷基残基且

R^{12} 表示羟烷基残基,

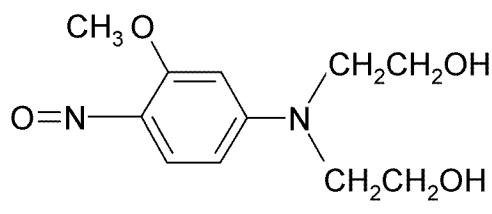
R^{11} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示二烷基氨基烷基残基、羟烷基、羟基烷氧基烷基或烷氧基烷基残基, 或者

R^{11} 和 R^{12} 形成被硫、氮或取代的氮残基分隔开的亚烷基残基, 或者

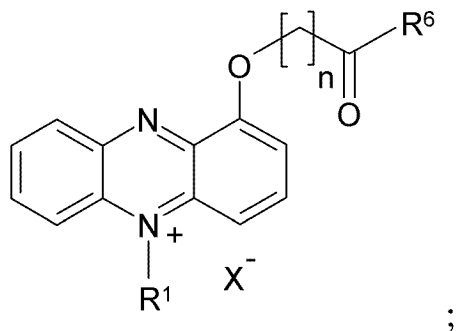
假如 R^{10} 与 $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ 是邻位, R^{11} 还与 R^{10} 一起表示亚烷基残基, 则其中 R^{12} 表示羟烷基残基, 或者,

R^{10} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示羟烷基残基或其盐。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述亚硝基苯胺具有下式 :



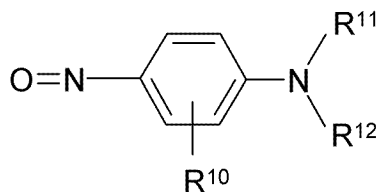
21. 权利要求 1 的方法,其中所述 5- 烷基吩嗪季盐具有下式:



其中 R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNR_2$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$, R^1 为 C_1 - C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1 - C_6 烷基, X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$, n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

22. 权利要求 21 的方法,其中 R^1 为 C_2H_5 。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述亚硝基苯胺具有下式:



且

R^{10} 表示氢、卤素、烷氧基或烷硫基,

R^{11} 表示烷基或羟烷基残基且

R^{12} 表示羟烷基残基,

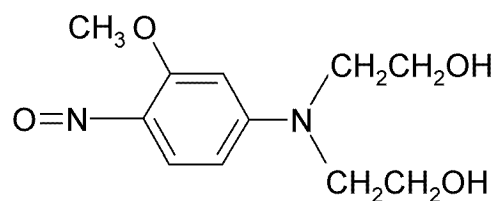
R^{11} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示二烷基氨基烷基残基、羟烷基、羟基烷氧基烷基或烷氧基烷基残基,或者

R^{11} 和 R^{12} 形成被硫、氮或取代的氮残基分隔开的亚烷基残基,或者

假如 R^{10} 与 $NR^{10}R^{11}$ 是邻位, R^{11} 还与 R^{10} 一起表示亚烷基残基,则其中 R^{12} 表示羟烷基残基,或者,

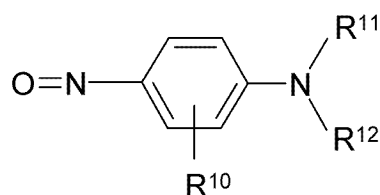
R^{10} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示羟烷基残基或其盐。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述亚硝基苯胺具有下式:



25. 具有降低的来自与分析物一起存在的其他组成成分干扰的用于测定液体样品中的分析物浓度的方法,所述方法包括使分析物与包含葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和光化学上稳定的 1-羧基烷氧基-5-烷基吩嗪的基质反应以提供电活性剂,其中所述基质在约 6.5-约 8.5 的 pH 是稳定的且是光化学上稳定的,测量由电活性剂产生的电化学反应,根据所测量的电化学反应测定液体样品中分析物的浓度。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述亚硝基苯胺具有下式:



其中

R^{10} 表示氢、卤素、烷氧基或烷硫基,

R^{11} 表示烷基或羟烷基残基且

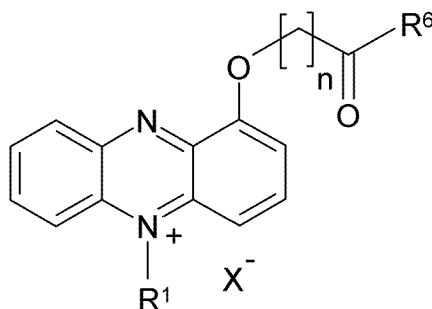
R^{12} 表示羟烷基残基,

R^{11} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示二烷基氨基烷基残基、羟烷基、羟烷基烷氧基烷基或烷氧基烷基残基,或者

R^{11} 和 R^{12} 形成被硫、氮或取代的氮残基分隔开的亚烷基残基,或者

假如 R^{10} 与 $NR^{11}R^{12}$ 是邻位, R^{11} 还与 R^{10} 一起表示亚烷基残基,则其中 R^{12} 表示羟烷基残基。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述 5-烷基-1-羧基烷氧基吩嗪为具有下式的化合物:



其中 R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNR_2$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$, R^2 为 C_1-C_6 烷基, R^1 为 C_1-C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$, 且 n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

具有改进的分析物特异性的生物传感器

[0001] 本申请是国际申请日为 2009 年 3 月 25 日的国际申请 PCT/EP2009/002157 进入中国、申请号为 200980120249.3 的题为“具有改进的分析物特异性的生物传感器”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 技术领域和背景技术

[0003] 本公开内容总的来讲涉及用于测定生物体液中分析物的存在和 / 或浓度的化学基质和方法。更准确但并非唯一地讲,本公开内容涉及当在干扰物质存在下用电化学生物传感器测定分析物时提高分析物特异性的化学基质和方法。本文所使用的术语“化学基质 (chemistry matrix)”是指含有能够与分析物反应的至少一种化学物质的物理区域。

[0004] 测定物质的浓度在许多领域中都十分重要,特别在其它混杂物质存在并且在各种条件下进行测定。例如,在各种条件下以及在干扰物质存在时测量体液 (例如血液) 中的葡萄糖,对有效治疗糖尿病至关重要。不能适当控制对血液葡萄糖水平可能产生严重的并发症,包括失明和四肢循环丧失,最终可能使糖尿病患者无法使用他 / 她的手指、手、脚等。

[0005] 试验带 (test strip) 常用来测量试样中选定分析物的存在和 / 或浓度。例如,使用多种试验带测量血液葡萄糖浓度以监测糖尿病患者的血糖水平。这些试验带包括反应室 (reaction chamber), 试剂组合物已沉积在其中。试验带的最新趋势需要更少的试样和更快的试验分析时间。当使用可从身体较不敏感区域 (例如前臂) 获得的较少试样时,为患者提供重要益处。另外,更快和更准确的测试时间提供了额外的便利,并能更好地控制患者血糖水平。

[0006] 已知用于测定分析物 (例如血样中的葡萄糖) 浓度的若干方法。这类方法通常属于以下两种类别之一:光学方法和电化学方法。光学方法一般包括观察试剂中光谱移动的反射光谱法或吸收光谱法。这类移动由产生颜色改变的化学反应引起,所述颜色变化表示分析物的浓度。电化学方法一般包括表示分析物浓度的电流反应、电量反应、电位反应和 / 或导电反应。参见例如 Columbus 的美国专利第 4,233,029 号、Pace 的 4,225,410、Columbus 的 4,323,536、Muggli 的 4,008,448、Lilja 等人的 4,654,197、Szuminsky 等人的 5,108,564、Nankai 等人的 5,120,420、Szuminsky 等人的 5,128,015、White 的 5,243,516、Diebold 等人的 5,437,999、Pollmann 等人的 5,288,636、Carter 等人的 5,628,890、Hill 等人的 5,682,884、Hill 等人的 5,727,548、Crismore 等人的 5,997,817、Fujiwara 等人的 6,004,441、Priedel 等人的 4,919,770 和 Shieh 的 6,054,039,所述专利通过引用以其整体并入本文。电化学方法通常在试剂存在时使用血糖仪 (但不总是) 测量血样的电化学反应。所述试剂与葡萄糖反应产生血液中并不存在的电荷载体。因此,预期在规定信号存在时血液的电化学反应主要取决于血液葡萄糖的浓度。用于电化学血糖仪的典型试剂公开于美国专利第 5,997,817、5,122,244,和 5,286,362 号,所述专利通过引用以其整体并入本文。

[0007] 当测量体液的的分析物水平时,多个误差源可得出不正确的结果。有时,传感器暴露于其中的恶劣条件使传感器的精确度变得更差。传感器偶尔可遭遇有害条件,常常称为“试验带腐坏 (strip rotting)”或“小瓶使用不当 (vial abuse)”,这是指当传感器在贮存期间使用不当以及暴露在不利条件下,例如过度的热、光和 / 或湿。这种在过度的热和 / 或湿

下的暴露,可导致反应时间由于酶活性丧失而减慢。

[0008] 在过去,这些问题通过使用具有非常快的反应时间并且与待测量的分析物有高比活的酶来避免。在所有测试条件下,例如在各种温度和血细胞比容水平下,通过使用具有这些特殊性质的酶,可实现具有高完成水平和同等完成水平的反应。然而,实际上,通常无法将量足够高的酶加入传感器中而又不引起传感器性能的严重丧失。另外,高比活的酶并不总是所有分析物所需要的。例如,用于测定葡萄糖水平的这类系统仍未能满足排除例如麦芽糖、半乳糖、木糖等干扰物作用的需要,这可能产生不准确的读数。

[0009] 例如,进行腹膜透析或 IGG 疗法的患者在他们的血液中可能遇到高水平的麦芽糖,这可能干扰准确的血液葡萄糖读数。因此,来自麦芽糖的干扰可能是一个重要问题。举例来说,雅培公司 (Abbott Laboratories) 的 Freestyle[®] 血液葡萄糖监测系统采用葡萄糖-染料-氧化还原酶 (GlucDOR) 与具有可变测试时间的电量技术结合。然而,这类系统由于受麦芽糖干扰,在临床上仍无法接受,而且实际上,正如目前的做法一样,利用电量分析有多个重大缺点。此外,已经尝试通过克隆新的对葡萄糖具有更大特异性的 GlucDOR 酶使麦芽糖干扰作用降到最低。然而,仍未获得可行的解决办法。

[0010] 在又一实例中,雅培公司的 PCx/TrueMeasure[™] 系统利用电流分析与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 依赖性葡萄糖脱氢酶 (GDH/NAD) 联用,提供基本排除了麦芽糖干扰的系统。然而,由于血氧水平 (pO₂) 干扰,电流分析系统可能提供不准确的读数,这是一种由包括何处取样在内的多个因素而引起葡萄糖水平读数变化的作用。例如,根据样品是毛细血管血、静脉血还是动脉血,血氧水平可能十分地不同。因此,为了使氧干扰降到最低,该系统的用户在取样前必须说明血样的来源或性质。正如可理解的那样,需要用户录入有关血样的信息可提供另外的错误源,如果用户错误录入了信息。

[0011] 除降低酶活性以外,当读取读数时,小瓶使用不当还可导致背景电流增加,背景电流有时称为“空白电流”。存在多种背景电流或空白电流来源。例如,最好是在使用传感器前,用来将电子从酶传递给电极的介体 (mediator) 处于氧化态。随时间推移,来自小瓶使用不当的热和 / 或湿度往往使介体还原。如果在传感器使用前,介体处于还原形式,则使还原形式的介体氧化的工作电极将产生部分电流。所得到的背景或空白电流势必偏向于介体,这进而可导致不准确的结果。试剂中的其它杂质也可能加重背景或空白电流的问题。

[0012] 有研究提出使用“烧除 (burn-off)”方法克服空白电流问题的电流传感器。在该方法中,将两个 DC 信号应用于传感器。第一 DC 信号,即烧除信号,是用来消耗或氧化造成同一扩散层的空白电流的任何物质,其稍后被用来对分析物进行分析。然后,第二信号,即分析信号,被用来对分析物的水平进行分析。烧除电位和分析电位两者具有相同的极性。虽然这种烧除技术降低了空白或背景电流的作用,但它是以使待测分析物部分氧化 (或还原) 为代价进行的,因此降低了传感器的噪声信号比。而且,这类技术未能弥补由像例如温度和具有慢 / 可变反应速率的酶等因素引起的反应时间的变化。另外,用于这类传感器的酶往往易受麦芽糖干扰。

[0013] 鉴于以上情况,用来测量分析物 (例如葡萄糖) 的生物传感器最好具有对分析物的特异性提高的化学基质,并且能够使由氧水平波动和由干扰物质 (例如麦芽糖) 引起的干扰降到最低。另外最好提供在光化学上是稳定的化学基质。

[0014] 本文公开的组合物、方法和装置的实施方案包括对分析物 (例如葡萄糖) 的特异

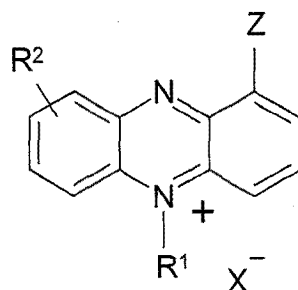
性提高的化学基质,所述化学基质能够使由氧水平波动和由相关物质(例如麦芽糖)引起的干扰降到最低。化学基质大体上包含葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、吩嗪衍生物和亚硝基苯胺。化学基质的优选的实施方案在约 6.5 ~ 约 8.5 的 pH 下通常是稳定的,并且在光化学上是稳定的。如果化学基质或其组分暴露在普通日光灯照明下至少一小时仍保持无色,则所述基质或其组分被视为在光化学上是稳定的。

发明内容

[0015] 本公开内容的第一个方面提供用于对分析物的浓度进行分析的化学基质组合物。在约 6.5 ~ 约 8.5 的 pH 下是稳定的这种化学基质在光化学上是稳定的,且包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、烷基吩嗪季盐和亚硝基苯胺。

[0016] 用于本公开内容的合适的烷基吩嗪季盐包括但不限于用下式 Ia 表示的 5-烷基吩嗪:

[0017]



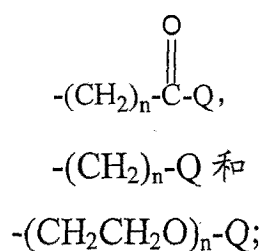
Ia

[0018] 其中:

[0019] Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NH-COCH_3$ 和 $-OY$,

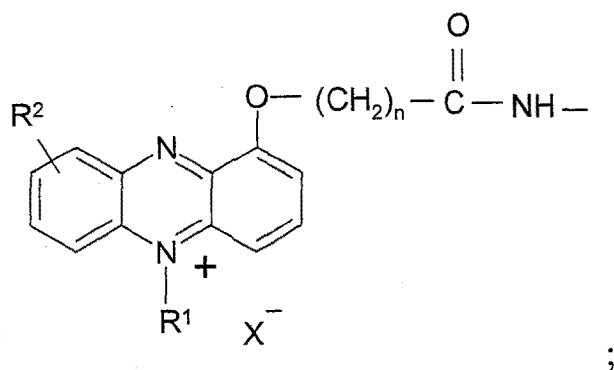
[0020] 其中 m 是 0 ~ 约 6 范围内的整数, Y 选自

[0021]



[0022] 其中 n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数, Q 为 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6OH$ 、 $-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_6-G$ 、 $-(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-(OCH_2CH_2)_6NR^2R^3$ 和 $-(OCH_2CH_2)_6OH$, 其中 G 为 $-COOH$ 、 NR^2R^3 , 或

[0023]

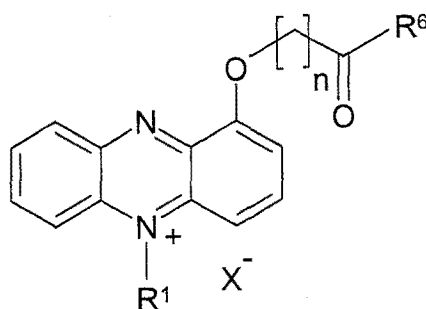


Ib

[0024] R^1 为 C_1-C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, n 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数; X 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$ 。

[0025] 本公开内容的第二个方面提供可用于测定分析物浓度的化学基质组合物, 其中所述化学基质包括用于测定分析物浓度的葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和光化学上稳定的 5-烷基-1-羧基烷氧基吩嗪。羧基烷氧基吩嗪基中的“羧基”包括羧酸、其盐、酯、酰胺、腈和其它已知的羧酸衍生物。特别合适的 5-烷基-1-羧基烷氧基吩嗪用下式 IIa 表示:

[0026]



IIa

[0027] 其中 R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$, R^1 为 C_1-C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$, n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

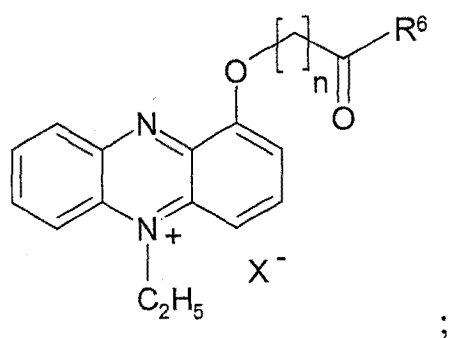
[0028] 本公开内容的第三个方面提供另一用于对分析物浓度进行分析的化学基质组合物。这种化学基质包括:

[0029] (a) 葡萄糖脱氢酶;

[0030] (b) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;

[0031] (c) 具有下式的吩嗪乙基硫酸盐 (phenazine ethosulfate);

[0032]

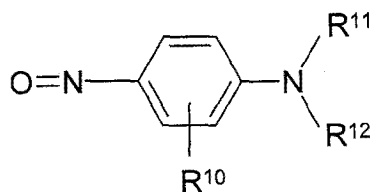


IIb

[0033] 其中 R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNH_2$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$, n 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数, m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数; 和

[0034] (d) 具有下式的亚硝基苯胺衍生物:

[0035]



III

[0036] 其中 R^{10} 为 $3-OCH_3$, R^{11} 和 $R^{12} = CH_2CH_2OH$ 。

[0037] 在这种化学基质中, 式 Ia 的吩嗪还可替换上式 II 的吩嗪。

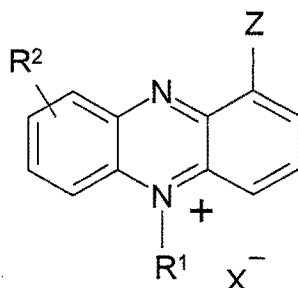
[0038] 本公开内容的第四个方面提供用于测定分析物浓度的化学基质组合物。该组合物包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和光化学上稳定的 1-羧基烷氧基-5-烷基吩嗪。

[0039] 本公开内容的第五个方面提供用于对液体样品中的分析物进行分析的电化学分析方法, 所述方法包括使分析物与包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和光化学上稳定的 1-羧基烷氧基-5-烷基吩嗪的基质反应, 得到能够产生电化学反应的电活性剂 (electro-active agent), 提供信号以产生电化学反应, 测量所产生的电化学反应, 根据所测的电化学反应确定液体样品中分析物的浓度。该方法通常包括将样品涂在生物传感器的应用区域, 在应用区域上具有包括上述化学基质的某一实施方案的试验带, 通过与化学基质反应对分析物进行定量测定。所述方法在测定范围为约 20mg/dL ~ 约 600mg/dL 的血液葡萄糖水平时特别有效, 并可提供约 5 秒钟或更少的测试时间。测试时间是指从将试样涂在试验带上 (或实际测定涂敷的试样) 到当获得测试结果并且显示在构造成能与生物传感器一起使用的监测装置的显示器上的时间。

[0040] 本公开内容的第六个方面提供用于对液体样品中的分析物进行电化学分析的方

法,所述方法包括将样品涂在具有包括化学基质的试验带的生物传感器的应用区域,通过与化学基质反应对分析物进行定量测定,使所述定量测定的结果显示在构造成能与所述生物传感器一起使用的监测装置的显示器上,其中所述化学基质包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和具有下式的 5-烷基吩嗪季盐:

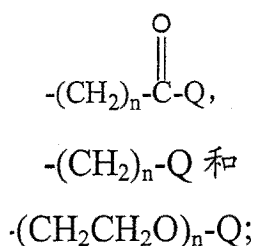
[0041]



[0042] 其中:

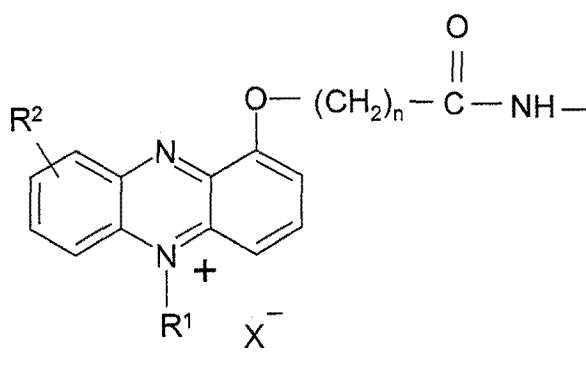
[0043] Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NH-COCH_3$ 和 $-OY$, 其中 m 可以是 0 ~ 约 6 范围内的整数, Y 选自

[0044]



[0045] 其中 n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数, Q 为 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_oNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_oOH$ 、 $-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_o-G$ 、 $-(CH_2)_oNR^2R^3$ 、 $-(OCH_2CH_2)_oNR^2R^3$ 和 $-(OCH_2CH_2)_oOH$, 其中 G 为 $-COOH$ 、 NR^2R^3 或

[0046]



[0047] R^1 为 C_1-C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, o 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数; X 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$ 。虽然多种亚硝基苯胺可用于本方法的化学基质,但是结构 III 所表示的亚硝基苯胺是特别适合的。

附图说明

[0048] 从优选的实施方案和下面的附图来看,本公开内容的多种优势和其它方面将是显而易见的。

[0049] 图 1 是与本公开内容实施方案一起使用的试验带的第一顶视图,包括揭开的试验带的覆盖层。

[0050] 图 2 是覆盖层在原位置的图 1 试验带的第二顶视图。

[0051] 图 3 示图表示用实施例 1 中所述新的化学基质测定的血液 / 葡萄糖反应的线性性质。

[0052] 图 4 示图表示在两种氧水平下且在范围为约 0 ~ 约 120mg/dL 的葡萄糖水平下缺乏氧干扰。

[0053] 图 5 示图表示在两种氧水平下且在范围为约 0 ~ 约 700mg/dL 的葡萄糖水平下缺乏氧干扰。

[0054] 图 6 示图表示使用常规试验带时麦芽糖的干扰,以及基于新的化学基质的试验带不存在干扰。

具体实施方式

[0055] 为了提高对本公开内容的原理的理解,下面将参考附图中列举的实施方案,并且将使用描述附图的专用术语。然而应当了解的是并不因此而限制本公开内容的范围。在所示装置中的这类改变和进一步的改进以及本公开内容所涉及领域的技术人员所能想到的与本文所述公开内容的原理一样的这类进一步的应用都包括在本公开内容的范围内。特别是虽然本公开内容从血糖仪方面进行探讨,但是预期本发明可与用于测量其它分析物和其它样品类型的装置一起使用。这类备选实施方案需要对本文所述实施方案作某种修改,这对本领域技术人员而言是显而易见的。

[0056] 本公开内容总的来讲涉及在相关成分(例如麦芽糖)和不同水平的无关联成分(例如氧)存在下,用于测定分析物(例如葡萄糖)浓度的化学基质。正如之前注意到的一样,麦芽糖的存在和氧水平的变化可能干扰用多种电化学生物传感器进行的葡萄糖测定。虽然下文将要描述有关血液葡萄糖水平分析的化学基质和相关方法,但是应当了解的是,所公开的化学基质和方法也可用来分析其它类型的分析物。

[0057] 本公开内容的实施方案包括用于测定生物体液中的分析物浓度的新的化学基质。新的化学基质组合物的实施方案通常包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、吩嗪衍生物和 / 或亚硝基苯胺或其衍生物。化学基质的不同实施方案与电化学生物传感器一起使用,在生物传感器内进行反应后测定分析物的浓度。吩嗪衍生物的实施方案包括在光化学上稳定的吩嗪衍生物,例如 1-取代-5-烷基吩嗪季盐。还包括更多的实施方案。本公开内容的另一个方面是使用所公开的化学基质的实施方案测定分析物浓度的方法。例如,所述方法可测定范围为约 20mg/L ~ 约 600mg/L 的血液葡萄糖水平,测试时间约为 5 秒钟或更少。在约 6.5 ~ 约 8.5 的 pH 下,化学基质可很好地起作用。

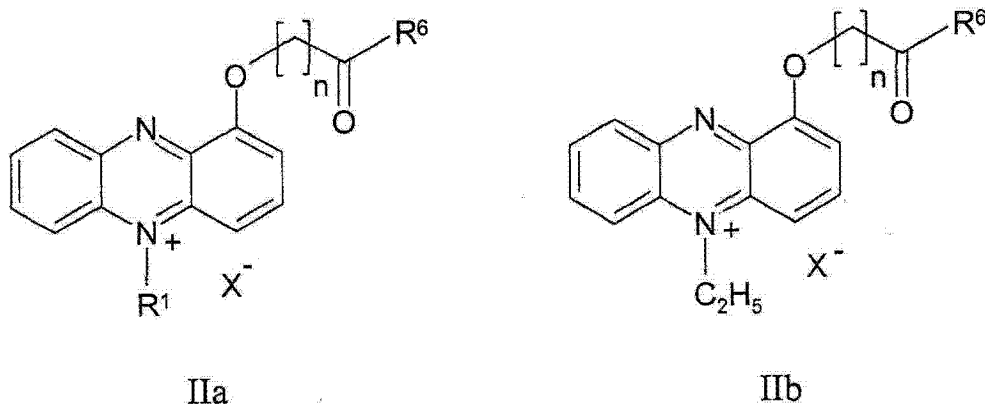
[0058] 下面将全面详细地描述新的化学基质。新的化学基质的组分可包括酶、辅因子、试剂和介体。当使用时,酶可为葡萄糖脱氢酶,辅因子可为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,试剂可为吩嗪衍生物,介体可为亚硝基苯胺。吩嗪衍生物的实施方案包括 5-烷基吩嗪季盐。应当了解的是,就亚硝基苯胺分子本身不直接参与通常用于电化学分析物检测和测量方法的

电子介导顺序 (electron mediating sequence) 的意义而言,亚硝基苯胺为间接电子介体的实例;更确切地讲,亚硝基苯胺通过与葡萄糖和化学基质的其它成分反应而参与所述介导顺序以产生一次或两次除去电活性的反应产物,而且正是电活性反应产物直接参与典型的介导顺序,更多详情和说明可参见美国专利第 5,122,244 和 5,286,362 号(出处同上)。尽管前面提到的情况,但随着对亚硝基苯胺是直接参与电化学介体顺序的介体的前体的了解,亚硝基苯胺和 / 或其衍生物在本文和由申请人所做和 / 或准备的其它文献中也可称为介体。

[0059] 吩嗪衍生物

[0060] 虽然不是必需的,但通常选择合适的吩嗪衍生物使得所述衍生物在光照下,特别是在约 7 ~ 约 8.5 的 pH 范围内是稳定的。合适的吩嗪衍生物包括 5- 烷基吩嗪季盐,例如上式 Ia 所述的及下文提供的式 IIa 和式 IIb 的 5- 烷基 -1- 取代吩嗪季盐类型:

[0061]

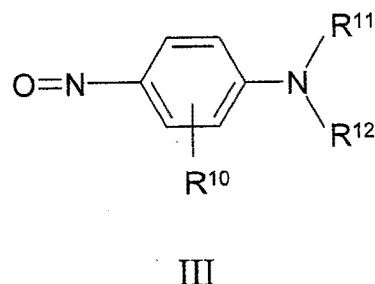


[0062] 其中 R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$, R^1 为 C_1 - C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1 - C_6 烷基, X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$, n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

[0063] 亚硝基苯胺

[0064] 具有通式 III 的亚硝基苯胺:

[0065]

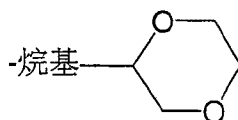


[0066] 其中 R^{10} 表示氢、卤素、烷氧基或烷硫基, R^{11} 表示烷基或羟烷基残基, R^{12} 表示羟烷基残基,或者 R^{11} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示在烷基部分被 OH 任选取代的二烷基氨基烷基残基、羟烷基、羟基烷氧基烷基或烷氧基烷基残基或者在烷基部分被羟基残基任选取代的聚烷氧基烷基残基,或者 R^{11} 和 R^{12} 形成被硫或氮间隔开的亚烷基残基,其中氮被烷基、羟烷基、羟基烷氧基烷基、烷氧基羟烷基、二氧杂环己烷基 (dioxanylyl)- 烷基或聚烷氧基烷基

残基取代,其每一个本身在烷基部分被羟基残基任选取代,或者如果 R^{10} 与 $NR^{11}R^{12}$ 是邻位, R^{11} 还与 R^{10} 一起表示亚烷基残基,则其中 R^{12} 表示羟烷基残基,或者如果亚烷基含有 3 碳原子,它还任选表示烷基残基。就此而论,卤素表示氟、氯、溴或碘。氟和氯是 R^{10} 的典型卤素。烷基、烷氧基或烷硫基是具有 1-6 个碳原子的残基,其中含有 1-3 个碳原子的基团是特别适合的。之前用于烷基的定义同样适用于羟烷基、二烷基氨基烷基、羟基烷氧基-烷基、烷氧基烷基、聚烷氧基烷基、烷氧基-羟烷基和二氧杂环己烷基-烷基残基中的烷基部分。

[0067] 二氧杂环己烷基-烷基是其中二氧杂环己烷环系与烷基残基结合的残基。它通常是 1,4-二氧杂环己烷环系,即

[0068]



IV

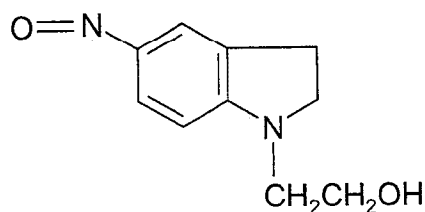
[0069] 聚烷氧基烷基残基是 -烷基-(烷氧基)_p-烷氧基残基,其中 p 等于 1-10。p 通常等于 1-4;p 更通常等于 1-3。

[0070] 亚烷基为直链或支链残基,优选为直链,并且可以是饱和或不饱和的,例如由 2-5 个、优选 2-4 个 C 原子组成的饱和烃链,具有两个游离结合部位。

[0071] 在被硫或氮间隔开的 R^{11} 和 R^{12} 的亚烷基残基的含义中,通过包含氮原子而形成的硫代吗啉或哌嗪残基是合适的。哌嗪残基尤其适合。

[0072] 在由 R^{11} 和 R^{12} 形成的亚烷基残基的含义中,通过包含通式 V 的芳环而形成的二氢吲哚或 1,2,3,4-四氢喹啉残基是适合。

[0073]



V

[0074] 作为本公开通式 III 的亚硝基苯胺衍生物的盐,强酸特别是无机酸(例如盐酸、硫酸、硝酸和磷酸)的盐是适合的。盐酸盐尤为适合。

[0075] 下列新的亚硝基苯胺衍生物是本发明化学基质特别合适的成分:

[0076] a) 2,2' -[(3-氟-4-亚硝基苯基)亚氨基]双-乙醇,

[0077] b) 2,2' -[(3-氯-4-亚硝基苯基)亚氨基]双-乙醇,

[0078] c) 2,2' -[(3-甲氧基-4-亚硝基苯基)亚氨基]双-乙醇,

[0079] d) 2,2' -[(3-甲基硫基-4-亚硝基苯基)亚氨基]双-乙醇,

[0080] e) 2-[(2-羟基乙氧基)乙基-(4-亚硝基苯基)氨基]乙醇,

[0081] f) 2-[(2-甲氧基乙氧基)乙基-(4-亚硝基苯基)氨基]乙醇,

[0082] g) 1-[N-(2-羟基乙基)-(4-亚硝基苯胺基)]-3-甲氧基-2-丙醇,

[0083] h) 1-[N-(2-羟基乙基)-(4-亚硝基苯胺基)]-3-(2-羟基乙氧基)-2-丙醇,

[0084] i) 1-甲基-4-(4-亚硝基苯基)-哌嗪,

[0085] j) 4-(4-亚硝基苯基)-1-哌嗪基-乙醇,

[0086] k) 5-亚硝基-1-二氢吡啶乙醇,

[0087] l) 1-甲基-6-亚硝基-1,2,3,4-四氢喹啉,

[0088] m) 6-亚硝基-3,4-二氢-1(2H)喹啉乙醇和其盐

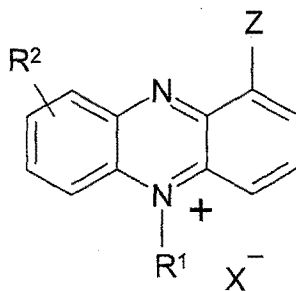
[0089] n) 2-[(2-羟基乙基-4-亚硝基苯基)氨基]乙醇。

[0090] 这些当中,化合物 a)、d)、e)、f)、g) 和 h) 及其盐特别适合。化合物 e) 或其盐,特别是盐酸盐尤其适合。

[0091] 吩嗪成分的制备

[0092] 化学基质中的成分之一包括吩嗪衍生物。吩嗪衍生物可选自多种不同取代的吩嗪,然而,5-烷基-1-取代吩嗪可用于本公开,最优选 5-乙基-1-取代吩嗪。在 5-烷基化吩嗪 1 位的多种不同的连接基团是适合的。合适的取代吩嗪包括下列提供的结构 Ia:

[0093]



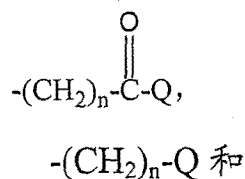
Ia

[0094] 其中:

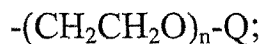
[0095] Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NH-COCH_3$ 和 $-OY$,

[0096] 其中 m 是 0 ~ 约 6 范围内的整数, Y 选自

[0097]

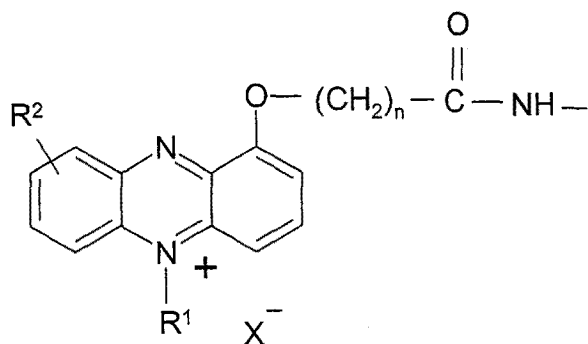


[0098]



[0099] 其中 n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数, Q 为 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_6OH$ 、 $-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_6-G$ 、 $-(CH_2)_6NR^2R^3$ 、 $-(OCH_2CH_2)_6NR^2R^3$ 和 $-(OCH_2CH_2)_6OH$, 其中 G 为 $-COOH$ 、 NR^2R^3 或

[0100]



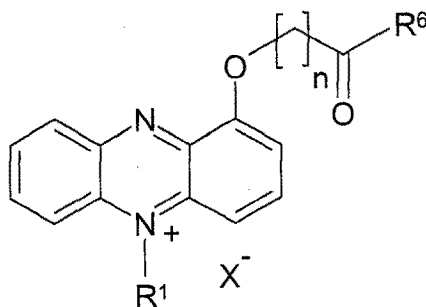
;

Ib

[0101] R^1 为 C_1-C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, n 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数; X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$ 。

[0102] 尤其合适的吩嗪衍生物可用下列提供的式 IIa 表示:

[0103]



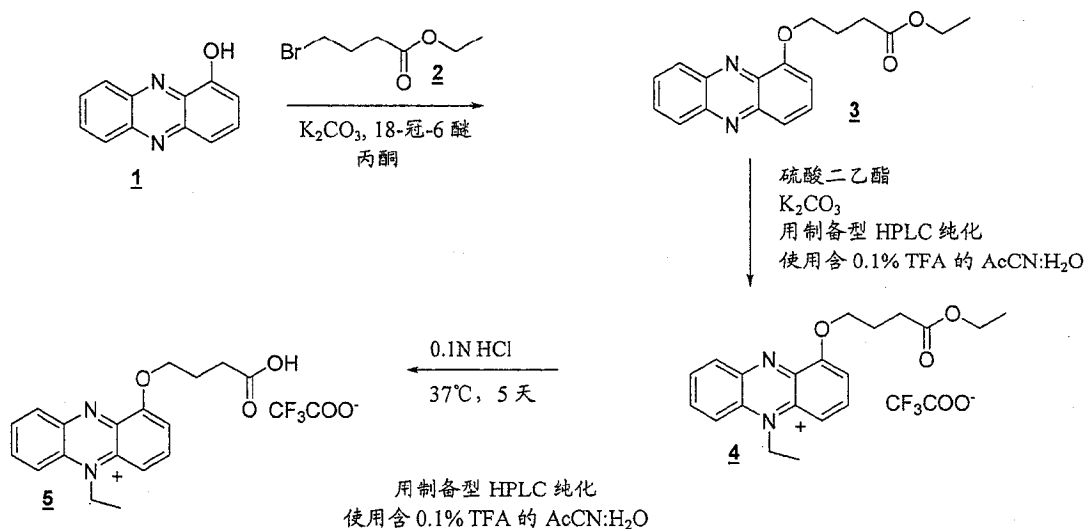
IIa

[0104] 其中 R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$, R^1 为 C_1-C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$, n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

[0105] 下列反应流程 1-9 列举了一些典型的可用于制备合适吩嗪衍生物的反应路线。

[0106] 流程 1

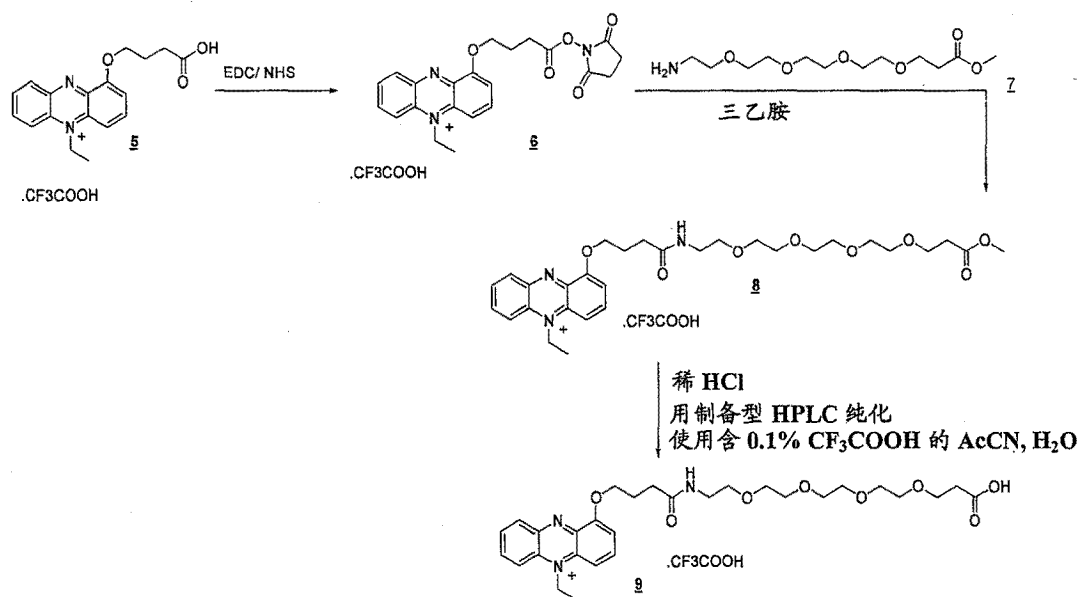
[0107]



[0108] 流程 1 表示 5-乙基-1-烷氧基羧酸吩嗪衍生物 (5) 的合成。该化合物的制备法参见文献 [参见 Eur. J. Biochem, 179, 293-298 (1989)]。然而,对合成方法进行了大量修改以提供必要量的取代吩嗪 (5)。

[0109] 1-羟基吩嗪 (1) 购自 TCI America。在回流条件下,在碳酸钾和 18-冠-6 醚的丙酮溶液存在时,使之与 4-溴丁酸乙酯反应,得到吩嗪乙酯 (3)。按照文献所述方法,吩嗪乙酯 (3) 与硫酸二乙酯的反应不会产生任何 N-烷基化产物。通过加入碱 (例如碳酸钾),对吩嗪乙酯 (3) 的 N-乙基化的反应过程进行了研究。因此,在碳酸钾存在下,使吩嗪乙酯 (3) 与硫酸二乙酯在 100°C 下反应 18 小时,得到 5-N-乙基 1-取代羧酸乙酯吩嗪衍生物 (4)。所得到的 5-N-乙基吩嗪乙酯用稀盐酸水解,得到 5-乙基-1-羧基丁基吩嗪衍生物 (5)。

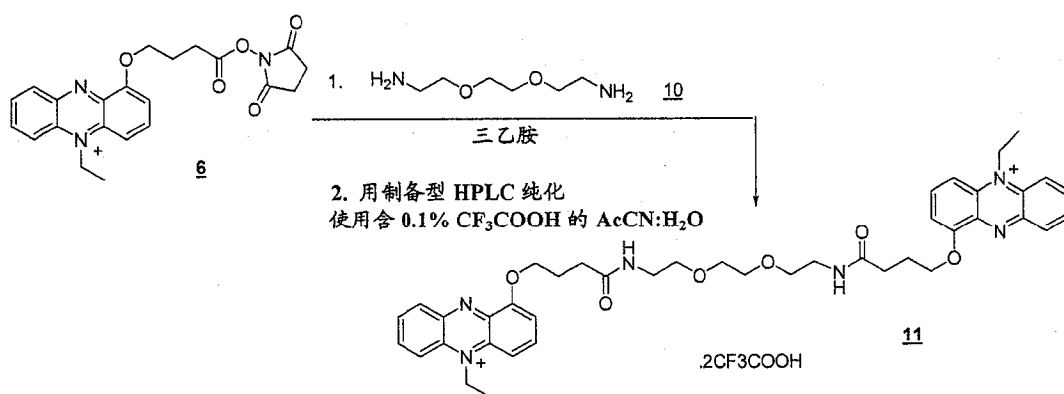
[0110]

流程 2

[0111] 流程 2 表示具有可影响吩嗪溶解度的亲水连接基的 1- 烷氧基 - 取代吩嗪衍生物 (9) 的合成。亲水取代吩嗪的可利用性允许较大范围的基质配制。使 5-N- 乙基吩嗪 1- 羟基丁酸衍生物 (5) 与 1- 乙基 N-3,3- 二甲基氨基丙基碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺反应, 得到相应的 N- 羟基琥珀酰亚胺。在叔碱 (例如三乙胺) 存在时, 使这种活性酯与市售的氨基 d-PEG₄ 甲酯 (Quanta Biodesign, USA) 反应。甲酯的脱保护可参见文献 (参见 Greene, T. 和 Wuts, P., "Protective Groups in Organic synthesis", 第 2 版, Wiley Intersciences, 1991)。在酸或碱存在下, 可使甲酯基团脱保护, 得到具有 PEG 连接基的吩嗪衍生物 (9)。已经证实在此吩嗪化学系统中甲酯用稀盐酸进行水解特别适合。

流程 3

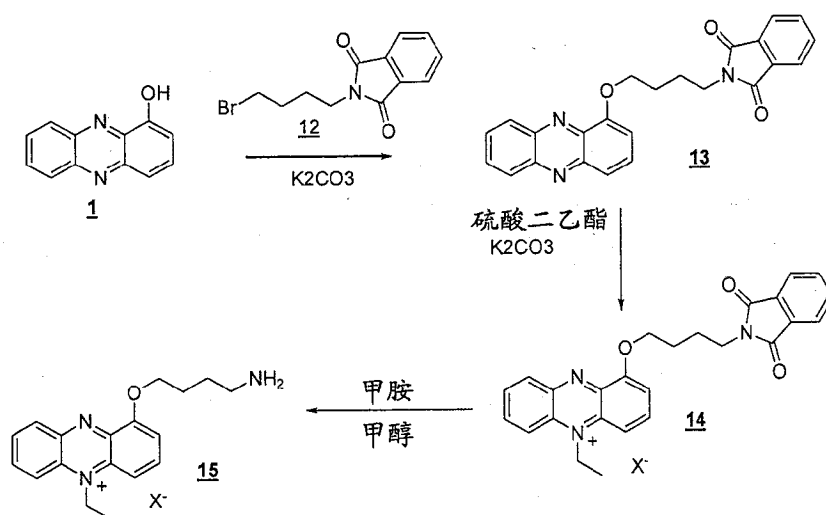
[0113]



[0114] 流程 3 描述了二聚吩嗪衍生物 (11) 的合成。包括吩嗪衍生物 (11) 的化学基质通常提供改进的灵敏度。在叔碱 (例如三乙胺或二异丙基乙胺) 存在时,在介于 0℃~室温的温度下,在溶剂 (例如二甲基甲酰胺或四氢呋喃) 中使活性酯 (6) 与 2,2-(亚乙基二氧基) 双乙胺 (Aldrich 化学公司,USA) 反应,可制备吩嗪衍生物 (11)。特别合适的碱/溶剂组合包括三乙胺/二甲基甲酰胺。

[0115] 流程 4

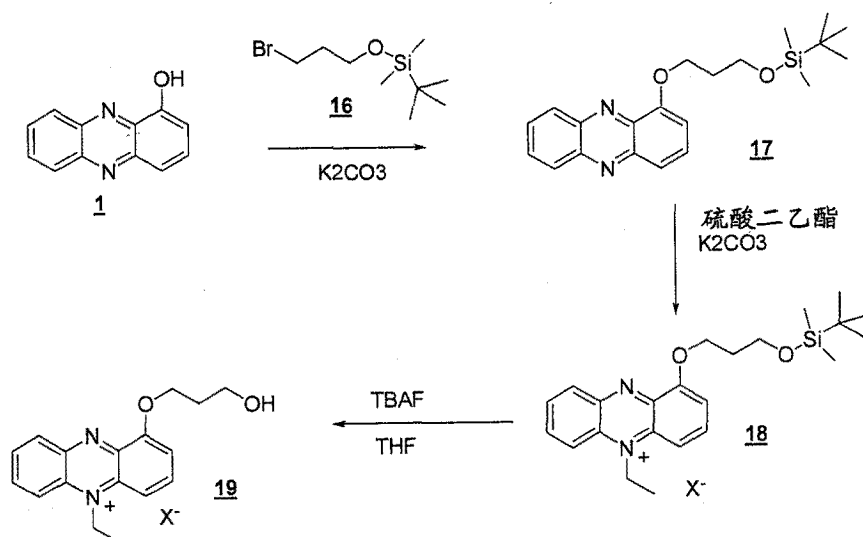
[0116]



[0117] 流程 4 说明用氨基封端的 1- 取代的 N- 乙基吩嗪的合成。可以使用末端氨基被保护的烷化剂 (例如苯二酰亚氨基或 t-Boc 衍生物) 进行 1- 羟基吩嗪的 O- 烷基化。所得到的 t-Boc 保护的胺可在酸性条件 (例如三氟乙酸) 下脱保护,而所得到的苯二酰亚氨基保护的胺可以在肼或甲胺存在下脱保护。一种特别合适的方法包括在回流条件下,在碱 (例如碳酸钾) 存在时,在溶剂 (例如丙酮、DMF 或 THF) 中使 1- 羟基吩嗪与 N-(4- 溴丁基) 邻苯二甲酰亚胺 (Acros Chemicals,USA) 反应。发现丙酮对于该反应是特别合适的溶剂。在碳酸钾存在下,使所得到的烷基化产物 (13) 与硫酸二乙酯反应,得到 N- 乙基苯二酰亚氨基保护的吩嗪 (14)。在室温下,苯二酰亚氨基用甲胺的甲醇溶液脱保护,得到用氨基封端的 1- 取代的 N- 乙基吩嗪 (15)。

[0118] 流程 5

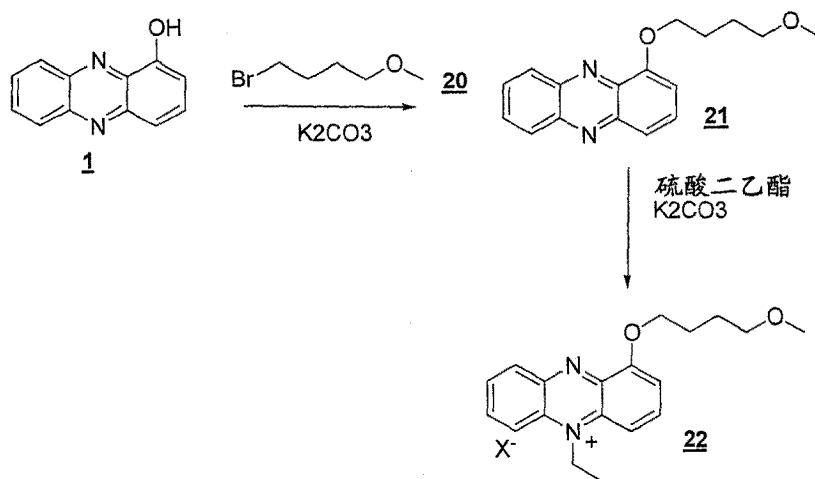
[0119]



[0120] 流程 5 描述了用羟基封端的 1-取代吩嗪衍生物的合成。在回流条件下,在碳酸钾的丙酮溶液存在时,使 1-羟基吩嗪 (1) 与羟基被保护的烷化剂例如 (3-溴丙氧基)-叔丁基二甲基甲硅烷 (16) (Aldrich 化学公司,USA) 反应,得到叔丁基二甲基甲硅烷 (TBDMS) 保护的吩嗪衍生物 (17)。在碳酸钾存在下,用硫酸二乙酯对 (17) 进行 N-烷基化,得到 N-乙基 1-取代的被保护的羟基封端的吩嗪衍生物 (18)。TBDMS 基团的脱保护在室温下在氟化四丁铵 (TBAF) 的 THF 溶液存在时进行,得到 1-羟基丁基 N-乙基吩嗪 (19)。

[0121] 流程 6

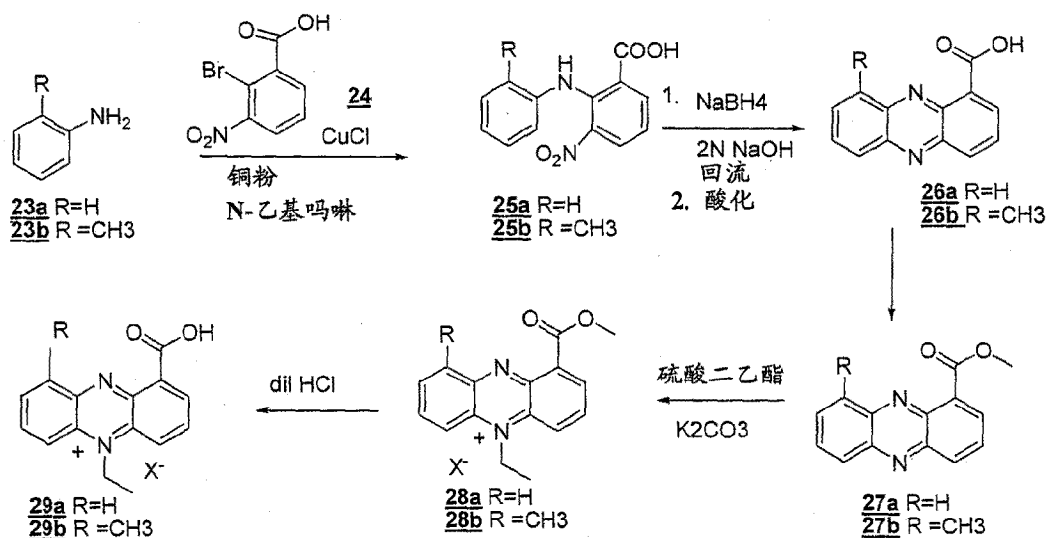
[0122]



[0123] 流程 6 对 N-乙基吩嗪 1-羟基丁基甲基醚的合成进行了说明。吩嗪醚 (21) 通过用 4-甲氧基丁基溴 (Aldrich 化学公司,USA) 烷基化 1-羟基吩嗪 (1) 来制备,得到吩嗪衍生物 (21)。N-乙基吩嗪 (22) 通过在碳酸钾存在时使化合物 (21) 与硫酸二乙酯反应来制备。

[0124] 流程 7

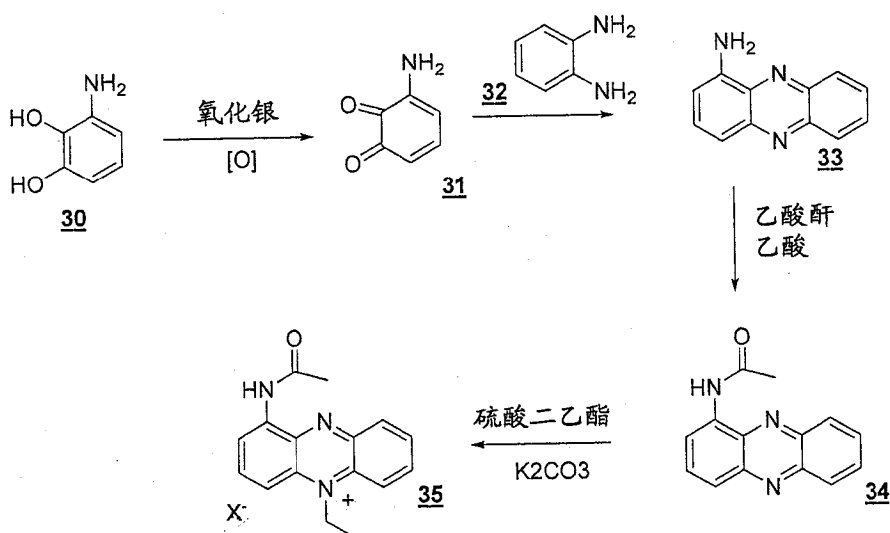
[0125]



[0126] 反应流程 7 对 1-羧基 N-乙基吩嗪 (**29a**) 和 8-甲基 1-羧基 N-乙基吩嗪 (**29b**) 衍生物的合成进行了说明。在 CuCl、铜粉和 N-乙基吗啉的丁烷-2,3-二醇溶液存在时,使苯胺(或邻甲苯胺)和 2-溴-3-硝基苯甲酸的混合物在 70-80℃ 下反应 8-24 小时。此反应混合物用 0.1M NH₄OH 溶液稀释后,经硅藻土床过滤。将所得到的溶液慢慢倒入 2N HCl 中,得到 N-苯基-3-硝基邻氨基苯甲酸 (**25a**) 或甲基取代的衍生物 (**25b**)。在回流条件下,使中间体 (**25a**) 或 (**25b**) 与硼氢化钠的 2N NaOH 溶液反应以实现闭环,并得到吩嗪的钠盐,其经酸化,得到 (**26a**) 或 (**26b**)。吩嗪 1-羧基衍生物(或 8-甲基 1-羧基吩嗪)的酰氯通过与亚硫酸酐反应来制备,通过与甲醇的 HCl 溶液反应使所得到的酰氯转化为甲酯。所得到的吩嗪甲酯 (**27a**) 或 (**27b**) 用硫酸二乙酯和碳酸钾烷基化,得到相应的 N-乙基吩嗪衍生物 (**28a**) 或 (**28b**)。最后,吩嗪 (**28a**) 或 (**28b**) 的甲酯基团用稀盐酸水解,得到 (**29a**) 或 (**29b**)。

[0127] 流程 8

[0128]

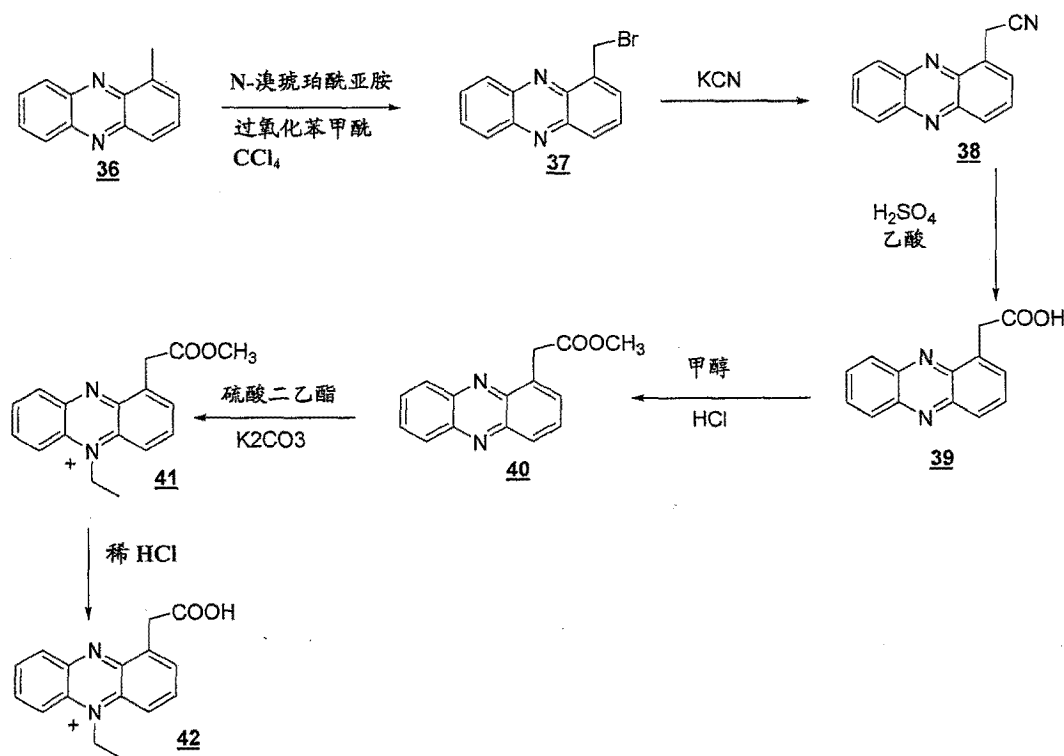


[0129] 流程 8 提供 1-乙酰氨基-N-乙基吩嗪衍生物 (**35**) 的合成路线。使 3-氨基-儿

茶酚盐酸盐 (30) 与氧化银和无水硫酸钠的乙酸乙酯溶液反应, 得到 3-氨基-1,2-醌 (31), 使之与邻苯二胺 (32) 原位进行进一步的反应, 得到 1-氨基吩嗪 (33)。氨基吩嗪 (33) 用乙酸酐的乙酸溶液乙酰化, 得到 1-乙酰氨基吩嗪 (34)。在碳酸钾存在下, 使所得到的 1-乙酰氨基吩嗪与硫酸二乙酯反应, 得到 N-乙基-1-乙酰氨基-吩嗪 (35)。

[0130] 流程 9

[0131]

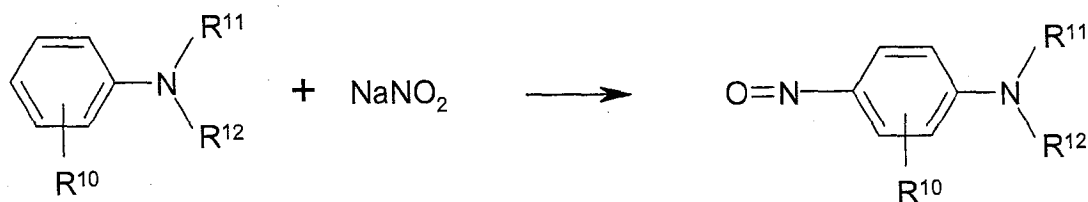


[0132] 流程 9 提供 1-羧甲基-5-N-乙基吩嗪衍生物 (42) 的合成路线。在过氧化苯甲酰和溶剂存在下, 使 1-甲基吩嗪 (36) (可获自 Apin Chemicals, UK) 与 N-溴琥珀酰亚胺反应, 形成溴衍生物 (37)。对于溴化反应四氯化碳是特别合适的溶剂。在合适的溶剂 (例如 DMF) 中, 使溴化物 (37) 与 KCN 反应, 得到 1-氰基甲基吩嗪衍生物 (38)。对氰基吩嗪 (38) 进行酸水解得到 1-羧甲基吩嗪 (39)。化合物 (39) 的酸基通过与甲醇和 HCl 反应转化为甲酯, 得到吩嗪酯 (40)。在碳酸钾存在下, 酯 (40) 可被硫酸二甲酯 N-烷基化, 得到 5-乙基吩嗪酯 (41)。酯 (41) 用稀盐酸水解, 得到 5-乙基-1-羧甲基吩嗪 (42)。

[0133] 亚硝基苯胺组分的制备

[0134] 通式 III 的化合物可通过使通式 VI 的化合物与亚硝酸盐反应而产生, 通式 VI 中 R^4 、 R^5 和 R^6 具有与通式 III 的化合物相同的含义。有关式 III 的详情见上文。

[0135]



VI

III

[0136] 一种类似方法可参见 J. J. D' Amico 等, J. Amer. Chem. Soc. 81, 5957 (1959)。

[0137] 碱金属亚硝酸盐 (Alkali nitrite) 通常用作亚硝酸盐, 其中锂、钠、钾、铷或铯可作为碱金属; 亚硝酸钠和亚硝酸钾特别适合。亚硝酸钠尤其适合。该反应通常在低温下在酸性介质中发生。当温度低于 10°C 时, 优选介于 -10°C 和 +5°C 时是有利的。

[0138] 当通式 VI 的化合物与亚硝酸盐的反应在含水介质中发生时是有利的。介质合适的 pH 小于 3, 小于 2 是特别合适的。

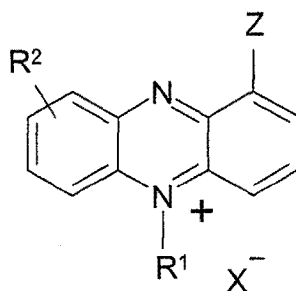
[0139] 在反应的一个实施方案中, 先将通式 VI 的化合物或其盐 (例如盐酸、硫酸、硝酸或磷酸等无机酸的盐) 加入含水酸性介质中后冷却。

[0140] 然后, 在将反应混合物保持在低温下的同时, 加入通常为溶解形式的亚硝酸盐。当含水介质还用作亚硝酸盐的溶剂时是有利的。当加入亚硝酸盐后, 将反应混合物保持在低温下, 直到反应完成。为了处理反应混合物, 通常用有机溶剂萃取, 将产物从萃取物中分离出来。

[0141] 化学基质

[0142] 化学基质的第一个实施方案包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、5-乙基吩嗪季盐和亚硝基苯胺。虽然不是必须的, 但是合适的季盐通常是光化学上稳定的。光化学稳定的 5-乙基季盐的实例用式 Ia 和式 IIb 表示:

[0143]



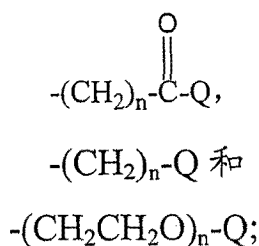
Ia

[0144] 其中:

[0145] Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NH-COCH_3$ 和 $-OY$,

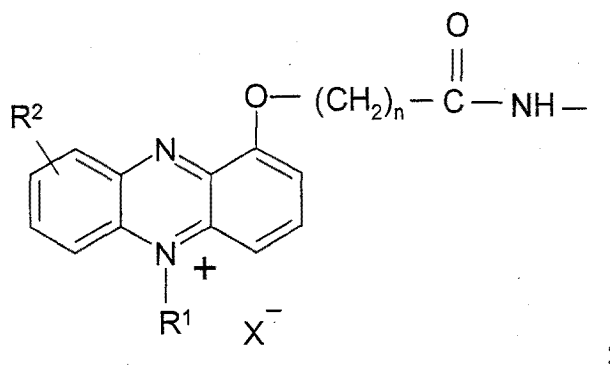
[0146] 其中 m 是 0 ~ 约 6 范围内的整数, Y 选自

[0147]



[0148] 其中 n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数, Q 为 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^1$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}^2$ 、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2\text{R}^3$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{G}$ 、 $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2\text{R}^3$ 、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{NR}^2\text{R}^3$ 和 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$, 其中 G 为 $-\text{COOH}$ 、 NR^2R^3 或

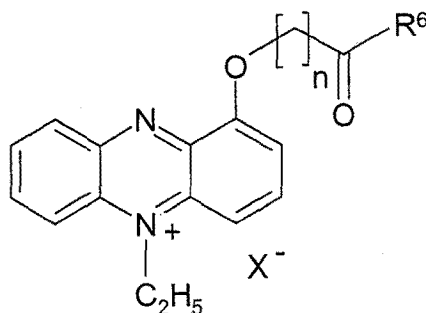
[0149]



Ib

[0150] R^1 为 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基, m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数; X 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $\text{CH}_3\text{OSO}_2^-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OSO}_2^-$ 和 CH_3SO_3^- ; 和

[0151]



IIb

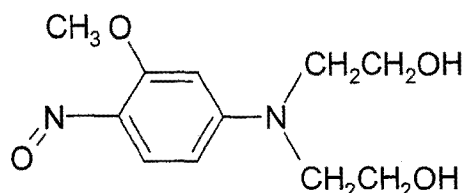
[0152] 其中 R^6 选自 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^1$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}^2$ 、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2\text{R}^3$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2$ 和 $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$, R^1 为 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基, X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $\text{CH}_3\text{OSO}_2^-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OSO}_2^-$ 和 CH_3SO_3^- , n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

[0153] 化学基质的进一步实施方案包括具有上述式 IIa 或式 IIb 所示化学式的吩嗪烷基季盐。合适的季盐通常是光化学上稳定的, 并且在约 6.5 ~ 约 8.5 的 pH 下是稳定的。本实

实施方案的其它成分可包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 / 或亚硝基苯胺。合适的亚硝基苯胺用上文提供的式 III 表示。

[0154] 化学基质的更进一步实施方案包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、用上文提供的式 IIb 表示的 5- 乙基吩嗪季盐、用式 VII 表示的 1,4- 亚硝基苯胺。

[0155]



VII

[0156] 合适的吩嗪季盐通常是光化学上稳定的。

[0157] 化学基质组合物的更进一步实施方案包括光化学上稳定的 5- 烷基吩嗪季盐。组合物另可含有葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和亚硝基苯胺。合适的吩嗪季盐用上文提供的式 I 表示。合适的亚硝基苯胺用上文提供的式 III 表示。

[0158] 另一个实施方案包括使用化学基质的实施方案测定分析物样品浓度（特别是血液葡萄糖）的方法或测定法。所述方法包括使用如上所述的生物传感器和试验带配置。在化学反应中使用化学基质以测定分析物的浓度。某些方法使用包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、5- 烷基吩嗪季盐和亚硝基苯胺的化学基质。某些其它方法使用式 IIb 表示的 5- 烷基吩嗪季盐，另有其它方法使用式 VII 表示的亚硝基苯胺。本文所用方法可用于在约 5 秒钟或更少的测试时间内分析含有约 20mg/L ~ 约 600mg/L 血液葡萄糖的样品。在范围为约 6.5 ~ 约 8.5 的 pH 下使用化学基质可获得最佳结果。

[0159] 参照附图进一步公开了本公开内容的各方面。图 1 和图 2 表示适于与本文所述化学基质和方法一起使用的电流电化学分析物传感器 20。应当了解的是，图 1 和图 2 中的传感器 20 仅仅是可与本公开内容的化学基质和方法联用的传感器类型的实例，同样可使用具有不同配置的其它传感器类型。例如，虽然图 1 和图 2 所示传感器具有交错排列形成的电极，但是具有不同配置或带有额外电极的传感器可与所公开的化学基质和方法一起使用。再举例来说，在所列举的实施方案中的电极具有共面配置，但是应理解为在其它实施方案中，电极 22 可具有其它配置，例如面对结构 (facing construction)。为了简便及清楚起见，下文中不会详尽描述传感器系统的所有特征，但会参照有助于本发明化学基质和方法的其它传感器类型的实例，包括美国专利第 5,989,917 号、美国专利第 6,270,637 号以及美国公布的申请号 2003/0155237A1 中所描述的类型，所有所述专利通过引用以其整体并入本文。

[0160] 下面来看图 1，传感器 20 包括置于挠性底材 24 上的交错排列的电极 22。成对电极 22 中的一个用作工作电极，另一个电极用作对电极。然而，正如前面说明的一样，本公开内容的一个实施方案的电极 22 可转换角色。也就是说，电极 22 在某一时间可用作工作电极，在另一时间可用作对电极。在列举的实施方案中，显示出两个电极 22，但应当了解的是，其它实施方案中传感器 20 可包括更多的电极。电极 22 与导电连接器 26 连接，导电连接器

包括位于挠性底材 24 表面上的接触垫 28, 其中接触垫 28 可与外部电子电路 (例如仪表) 接触。连接器 26 还包括连接器部分 30, 它使电极元件在排列 22 上与接触垫 28 连接并通常可用绝缘层覆盖。

[0161] 参照图 2, 绝缘间隔层 32 被放置在连接器 26 的底材 24 和连接器部分 30 之上。间隔层 32 限定出毛细管样品室 34, 样品室 34 有一个进口, 液体样品从中吸入样品室 34 内。试剂层 35 被放置在样品室 34 内排列 22 之上。对试剂层 35 进行配置以分析液体样品, 将在下文中更详尽描述试剂层 35。箔纸 36 覆盖间隔层 32 和气孔 38 以外的毛细管室 34 的一部分, 使用气孔从室 34 中排气。

[0162] 基质溶液的制备

[0163] 标准基质溶液

[0164] 将 25.148g 1,4- 哌嗪二乙磺酸倍半钠盐、0.125g 曲通 X-100 和 2.40g 海藻糖加入 400mL 重蒸水中, 调节溶液的 pH 至 7.00, 来制备储备缓冲液。将该溶液加入 500mL 量瓶中, 用重蒸水稀释成 500mL 溶液。将 396 克初始缓冲液溶液与 2g 聚环氧乙烷 (300K) 和 2g 纤维素羟乙基醚 250M 混合, 完成缓冲液 / 聚合物溶液的制备。静置过夜后, 全部固体溶解, 溶液准备就绪备用。

[0165] 用储备缓冲液如下制备基质溶液: (a) 以连续方式将下列成分加入 25mL 装有 11.198g 缓冲液储备液的加速混合杯中, 在每次加入后以 33,000rpm 快速混合 1 分钟: 0.5592g KCl、0.1824g 一级 NAD 和 0.0913g 取代亚硝基苯胺 (结构 VII); (b) 调节 pH 到 7.00; 和 (c) 将 0.0163g 1-(3- 羧基丙氧基)-5- 乙基吩嗪 (流程 1 的 5) 加入容器中以 33,000rpm 混合 1 分钟, 最后, 加入 0.6574g 葡萄糖脱氢酶, 以 33,000rpm 快速混合 2 分钟。

[0166] 使用备选吩嗪的其它基质溶液

[0167] 可用备选的 1- 取代吩嗪衍生物替换 1-(3- 羧基丙氧基)-5- 乙基吩嗪, 或者同样用备选的亚硝基苯胺替换式 VI 表示的亚硝基苯胺, 采用上文提供的同样方法制备基质溶液。合适的吩嗪衍生物通常在光化学上是稳定的。虽然式 II 表示的 1- 乙基-5- 取代吩嗪季盐可能更适合, 但是也可使用式 I 表示的其它 1- 烷基-5- 取代吩嗪季盐。

[0168] 使用备选亚硝基苯胺的其它基质溶液

[0169] 可通过上文提供的方法, 用式 III 表示的亚硝基苯胺替换式 VII 表示的亚硝基苯胺来制备基质溶液。

[0170] 试验带的制备

[0171] 向具有间隔层和毛细管设计的 ACCU-CHEK® Aviva 牌电极卡的每个电极通道中加入上述约 1.8 μ L 的碱性基质溶液, 在约 45°C 下干燥约 1 分钟。将干燥卡保存在干燥气氛下过夜, 将亲水性顶层箔手工层压在间隔层上。将电极卡切成合适条带, 保存在干燥小瓶中备用。该方法同样可用来制备基于若干上述基质溶液的试验带。

[0172] 全血剂量反应的研究

[0173] 用上述碱性基质溶液制备的试验带测量含有 7 种不同水平的葡萄糖 (约 50 ~ 约 600mg/dL) 的全血样品, 使用约 2.5 秒钟延迟和约 2.5 秒钟读数, 这是指在使样品与试验带接触后约 2.5 秒钟施加信号, 在施加信号后约 2.5 秒钟读取计数。在使样品与试验带接触后约 5 秒钟测定平均电流, 得到电流与葡萄糖浓度之间的线性关系。葡萄糖浓度和电流读

数之间的线性关系的建立有利于使用化学基质对分析物（例如葡萄糖）进行分析。结果见图 3。使用从上述若干基质溶液制备的试验带得到同样的结果。

[0174] 不同氧水平下的基质性能

[0175] 葡萄糖水平范围为约 0 ~ 约 110mg/dL 的血液葡萄糖样品用约 39mm Hg 氧和约 100mm Hg 的氧饱和,使用上述用碱性基质溶液制备的试验带,测定葡萄糖水平。使样品进行约 3 秒钟延迟和约 2 秒钟读数。在约 5 秒钟时测定平均电流并作图。两种氧水平都不影响葡萄糖测量,如图 4 所提供的曲线图所示。用从上述备选基质溶液制备的试验带重复该实施例得到同样的结果。

[0176] 在随后的测试中,葡萄糖水平范围为约 50 ~ 约 600mg/L 的血样用约 42mmHg 氧和约 135mmHg 的氧饱和,使用上述由碱性基质溶液制备的试验带,测定了葡萄糖水平。两种氧水平在如图 5 所示的较大浓度范围内都不影响葡萄糖测量。用由上述备选基质溶液制备的试验带重复该实施例得到同样的结果。

[0177] 麦芽糖干扰研究

[0178] 将 21mM 麦芽糖加入 200mL 盐水溶液中,来制备麦芽糖储备液。制备含有范围为约 10 ~ 约 550mg/L 葡萄糖水平的 6 个血样。将每个样品分成两部分,向一系列样品每份 1mL 试样中加入 0.05mL 麦芽糖储备液。向第二系列样品 1mL 试样部分中加入等体积的盐水溶液。用标准 ACCU-CHEK® Aviva 牌试验带和具有基本相同构件但含有上述新的化学基质的试验带,测定了样品的葡萄糖含量。如图 6 中所示,麦芽糖提高了用标准 ACCU-CHEK® Aviva 牌试验带的测量值,而用新的化学基质测得的测定值与不含麦芽糖样品的基本相同。用由上述备选基质溶液制备的试验带重复该项研究,得到同样的结果。ACCU-CHEK® 和 Aviva 是 Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Stra ß e 116, D-68305 Mannheim, Germany 注册的美国商标。

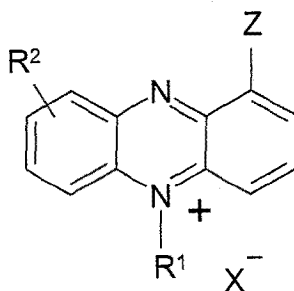
[0179] 虽然在附图和前面的说明书中详细列举和描述了本公开内容,但是附图和说明书被视为说明性的,并且在性质上不是限制性的,要理解的是只显示和描述了所选定的实施方案,落入前述本公开内容和 / 或随附权利要求书所规定的精神内的所有变动、修改和等同内容都需要受到保护。另外,本文引用的所有出版物表示本领域的技术水平,通过引用其整体特此结合,就如每个出版物都通过引用和完全陈列而分别结合一样。

[0180] 下面是本发明的优选实施方案一览:

[0181] 1. 用于测定分析物浓度的化学基质组合物,所述基质包含葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、5- 烷基吩嗪季盐和亚硝基苯胺,其中所述基质在约 6.5 ~ 约 8.5 的 pH 下是稳定的,并且在电化学上是稳定的。

[0182] 2. 优选的实施方案 1 的组合物,其中所述 5- 烷基吩嗪季盐为具有下式的化合物;

[0183]

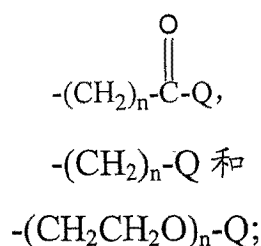


[0184] 其中：

[0185] Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NH-COCH_3$ 和 $-OY$ ，

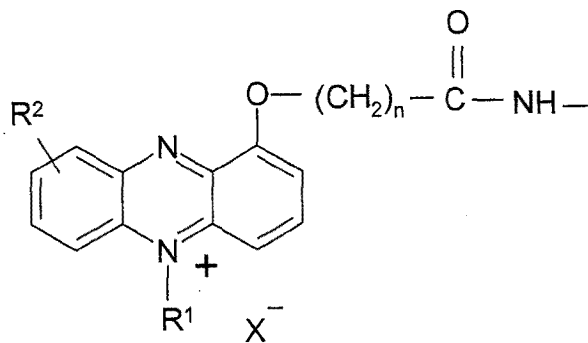
[0186] 其中 m 可以是 0 ~ 约 6 范围内的整数，Y 选自

[0187]



[0188] 其中 n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数，Q 为 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_oNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_oOH$ 、 $-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_oG$ 、 $-(CH_2)_oNR^2R^3$ 、 $-(OCH_2CH_2)_oNR^2R^3$ 或 $-(OCH_2CH_2)_oOH$ ，其中 G 为 $-COOH$ ， NR^2R^3 或

[0189]

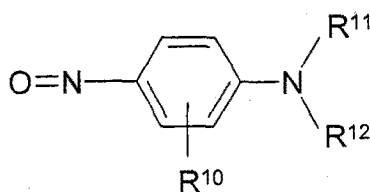


;

[0190] R^1 为 C_1-C_6 烷基， R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基，o 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数；X 为选自以下的阴离子：卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 如 $CH_3SO_3^-$ 。

[0191] 3. 优选的实施方案 1 的组合物，其中所述亚硝基苯胺为具有下式的化合物：

[0192]



[0193] 且

[0194] R^{10} 表示氢、卤素、烷氧基或烷硫基,

[0195] R^{11} 表示烷基或羟烷基残基,

[0196] R^{12} 表示羟烷基残基,或者

[0197] R^{11} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示二烷基氨基烷基残基、羟烷基、羟基烷氧基烷基或烷氧基烷基残基,或者

[0198] R^{11} 和 R^{12} 形成被硫、氮或取代的氮残基分隔开的亚烷基残基,或者

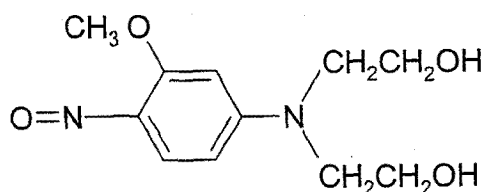
[0199] 假如 R^{10} 与 $NR^{11}R^{12}$ 是邻位, R^{11} 还与 R^{10} 一起表示亚烷基残基,则其中 R^{12} 表示羟烷基残基,或者,

[0200] R^{10} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示羟烷基残基或其盐。

[0201] 4. 优选的实施方案 2 的化学基质,其中 R^1 为 C_2H_5 。

[0202] 5. 优选的实施方案 4 的化学基质,其中所述亚硝基苯胺具有下式:

[0203]



[0204] 6. 优选的实施方案 5 的化学基质组合物,其中 Z 为 $-O-(CH_2)_3COH$ 。

[0205] 7. 优选的实施方案 5 的化学基质组合物,其中 Z 为 $-O-(CH_2)_4CO-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_4-COOH$ 。

[0206] 8. 优选的实施方案 5 的化学基质组合物,其中 Z 为 $-O-(CH_2)_4-NH_2$ 。

[0207] 9. 优选的实施方案 5 的化学基质组合物,其中 Z 为 $-O-(CH_2)_3-OH$ 。

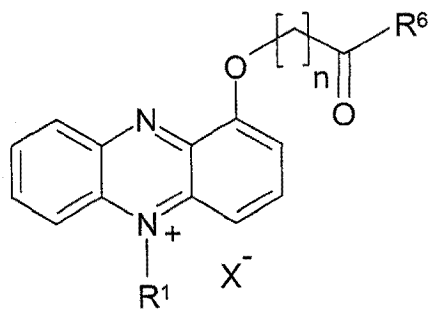
[0208] 10. 优选的实施方案 5 的化学基质组合物,其中 Z 为 $-O-(CH_2)_4-OCH_3$ 。

[0209] 11. 优选的实施方案 5 的化学基质组合物,其中 Z 为 $-(CH_2)_4COOH$ 。

[0210] 12. 优选的实施方案 5 的化学基质组合物,其中 Z 为 $-NH-COCH_3$ 。

[0211] 13. 用于对分析物浓度进行分析的化学基质组合物,所述组合物包含葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和具有下式的 5-烷基吩嗪季盐:

[0212]



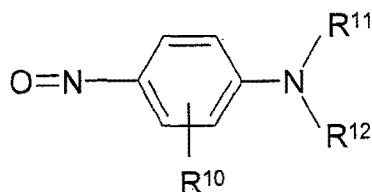
[0213] 其中 R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$, R^1 为 C_1-C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基, X^- 为

选自以下的阴离子：卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $\text{CH}_3\text{OSO}_2^-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OSO}_2^-$ 和 CH_3SO_3^- ，n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

[0214] 14. 优选的实施方案 13 的化学基质，其中 R^1 为 C_2H_5 。

[0215] 15. 优选的实施方案 14 的化学基质，其中所述亚硝基苯胺具有下式：

[0216]



[0217] 且

[0218] R^{10} 表示氢、卤素、烷氧基或烷硫基，

[0219] R^{11} 表示烷基或羟烷基残基，且

[0220] R^{12} 表示羟烷基残基，或者

[0221] R^{11} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示二烷基氨基烷基残基、羟烷基、羟基烷氧基烷基或烷氧基烷基残基，或者

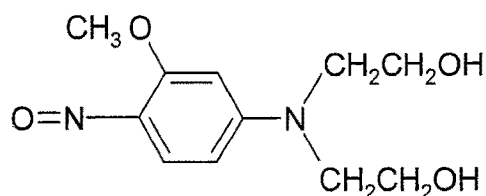
[0222] R^{11} 和 R^{12} 形成被硫、氮或取代的氮残基分隔开的亚烷基残基，或者

[0223] 假如 R^{10} 与 $\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$ 是邻位， R^{11} 还与 R^{10} 一起表示亚烷基残基，则其中 R^{12} 表示羟烷基残基，或者，

[0224] R^{10} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示羟烷基残基或其盐。

[0225] 16. 优选的实施方案 15 的化学基质，其中所述亚硝基苯胺具有下式：

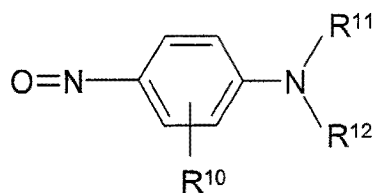
[0226]



[0227] 17. 用于对分析物浓度进行分析的化学基质组合物，所述组合物包含葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和光化学上稳定的 1-羧基烷氧基-5-烷基吩嗪，用于测定分析物的浓度。

[0228] 18. 优选的实施方案 17 的化学基质，其中所述亚硝基苯胺具有下式：

[0229]



[0230] 其中，

[0231] R^{10} 表示氢、卤素、烷氧基或烷硫基,

[0232] R^{11} 表示烷基或羟烷基残基,和

[0233] R^{12} 表示羟烷基残基,或者

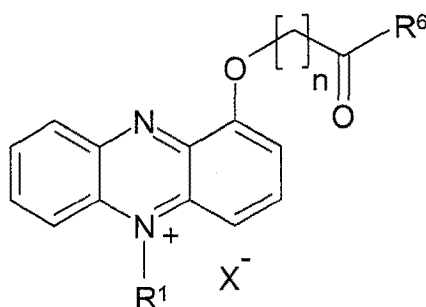
[0234] R^{11} 和 R^{12} 相同或不同且各自表示二烷基氨基烷基残基、羟烷基、羟基烷氧基烷基或烷氧基烷基残基,或者

[0235] R^{11} 和 R^{12} 形成被硫、氮或取代的氮残基分隔开的亚烷基残基,或者

[0236] 假如 R^{10} 与 $NR^{11}R^{12}$ 是邻位, R^{11} 还与 R^{10} 一起表示亚烷基残基,则其中 R^{12} 表示羟烷基残基。

[0237] 19. 优选的实施方案 18 的化学基质,其中所述 5-烷基-1-羧基烷氧基吩嗪为具有下式的化合物:

[0238]



[0239] 其中

[0240] R^6 选自 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_mOH$ 、 $-O(CH_2)_mNH_2$ 和 $-O(CH_2)_mOH$,

[0241] R^1 为 C_1 - C_6 烷基, R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1 - C_6 烷基,

[0242] X^- 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$, 且

[0243] n 和 m 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数。

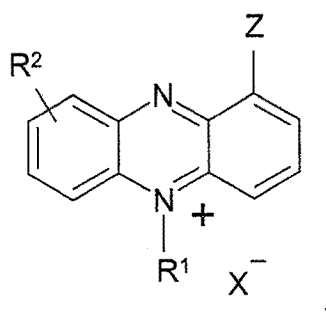
[0244] 20. 用于对液体样品中的分析物进行电化学分析的方法,所述方法包括使分析物与包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和光化学上稳定的 1-羧基烷氧基-5-烷基吩嗪的基质反应以提供电活性剂,测量由电活性剂产生的电化学反应,根据所测量的电化学反应测定液体样品中分析物的浓度。

[0245] 21. 优选的实施方案 20 的方法,其中所述分析物是葡萄糖,且所述样品含有约 20mg/dL ~ 约 600mg/dL 的血液葡萄糖。

[0246] 22. 优选的实施方案 20 的方法,其中所述化学基质的 pH 为约 6.5 ~ 约 8.5。

[0247] 23. 用于对液体样品中的分析物进行电化学分析的方法,所述方法包括将样品涂在具有包括化学基质的试验带的生物传感器的应用区域,通过与化学基质反应对分析物进行定量测定,使所述定量测定的结果显示在构造成能与所述生物传感器一起使用的监测装置的显示器上,其中所述化学基质包括葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、亚硝基苯胺和具有下式的 5-烷基吩嗪季盐:

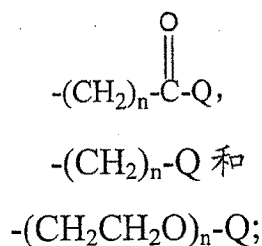
[0248]



[0249] 其中 Z 选自 $-(CH_2)_mCOOH$ 、 $-NH-COCH_3$ 和 $-OY$,

[0250] 其中 m 是 0 ~ 约 6 范围内的整数, Y 选自

[0251]



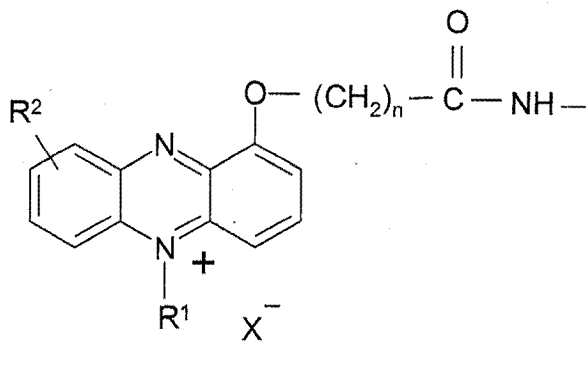
[0252] 其中

[0253] n 是约 1 ~ 约 4 范围内的整数;

[0254] Q 为 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^2$ 、 $-NR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_oNR^2R^3$ 、 $-NH(CH_2)_oOH$ 、 $-NHCH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_oG$ 、 $-(CH_2)_oNR^2R^3$ 、 $-(OCH_2CH_2)_oNR^2R^3$ 和 $-(OCH_2CH_2)_oOH$;

[0255] G 为 $-COOH$ 、 NR^2R^3 或

[0256]



[0257] 其中

[0258] R^1 为 C_1-C_6 烷基,

[0259] R^2 和 R^3 相同或不同且各自表示 H 或 C_1-C_6 烷基,

[0260] o 是约 1 ~ 约 6 范围内的整数;和

[0261] X 为选自以下的阴离子: 卤化物离子、硫酸根、烷基硫酸根、磷酸根、亚磷酸根、羧酸根、 CF_3COO^- 、 $CH_3OSO_2^-$ 、 $C_2H_5OSO_2^-$ 和 $CH_3SO_3^-$ 。

[0262] 24. 优选的实施方案 23 的方法, 其中可对具有范围为约 20 ~ 约 600mg/dL 的血液葡萄糖水平的所述样品进行所述定量测定。

[0263] 25. 优选的实施方案 23 的方法, 其中所述定量测定和所述显示发生在涂抹所述样

品后约 5 秒钟或更少。

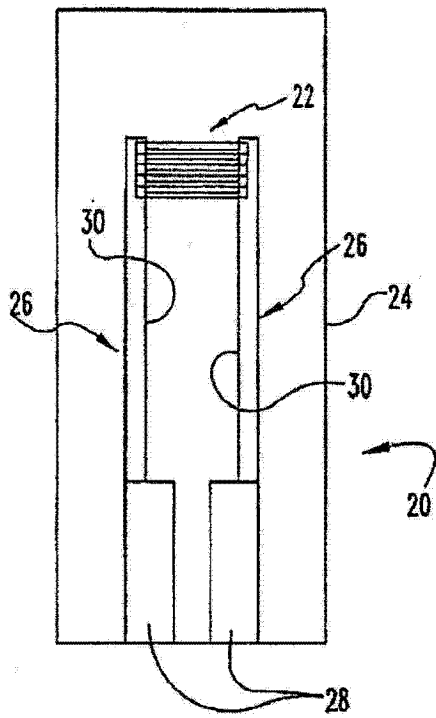


图 1

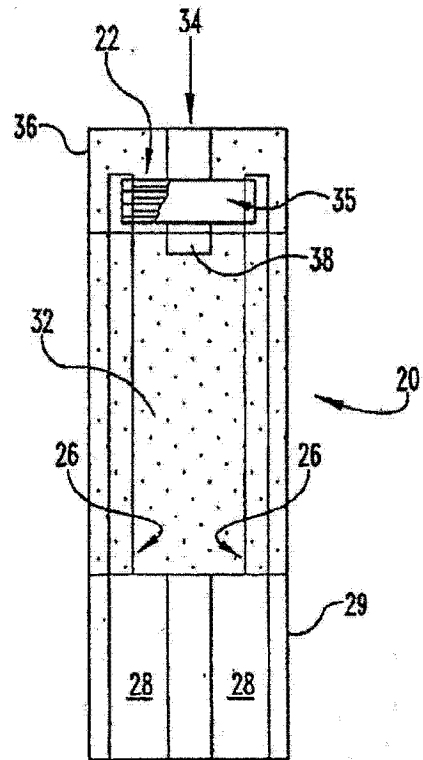


图 2

血液剂量反应

基质 - 15 μl 葡萄糖脱氢酶、2 mM 吩嗪 III ($\text{R}^1=\text{OH}$, $n=3$)、35 mM NAD 和
40 mM 亚硝基苯胺 VII

测试条件 - 2.5 秒钟延迟+2.5 秒钟读数, 电位 500 mV

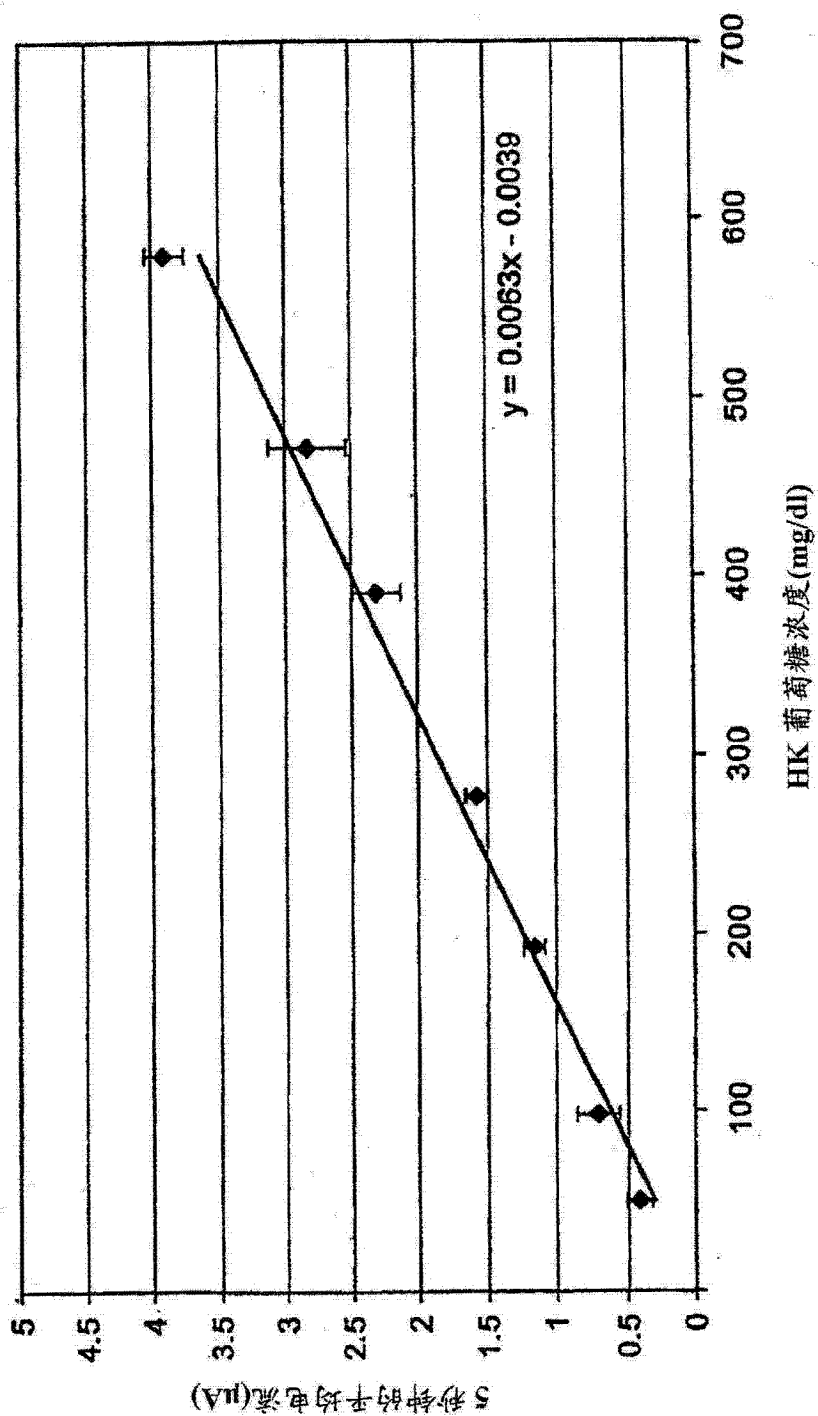


图 3

血液气体研究

基质 = 15 μ l 葡萄糖脱氢酶、2 mM 吩嗪 III ($R^1=OH$, $n=3$)、35 nM NAD 和
40 mM 亚硝基苯胺 VII

测试条件 - 2.5 秒钟延迟 + 2.5 秒钟读数, 电位 500 mV

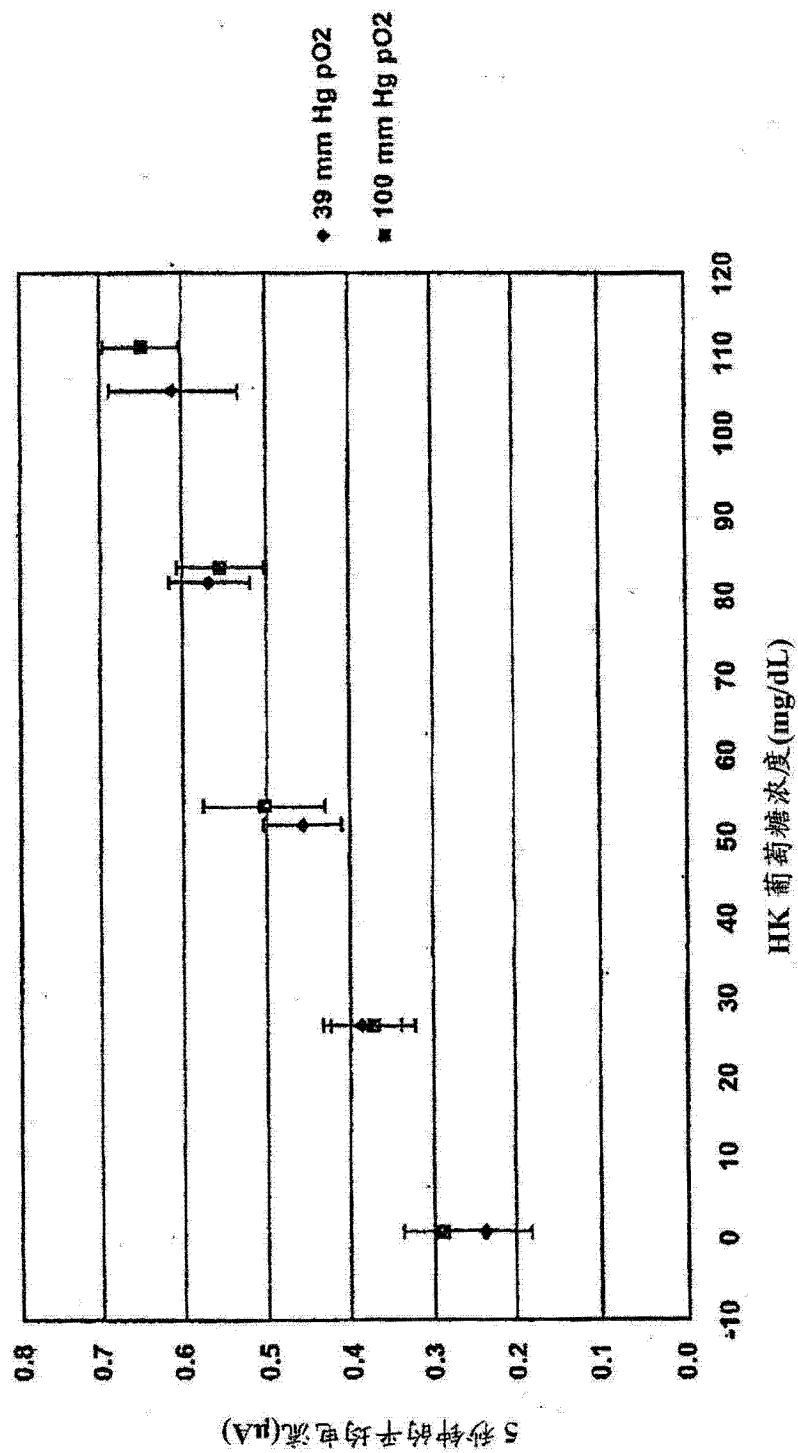


图 4

血液气体研究 2

基质 - 15 μl 葡萄糖脱氢酶、2 mM 吩嗪 III ($\text{R}^1=\text{OH}$, $n=3$)、35 mM NAD 和
40 mM 亚硝基苯胺 VII

测试条件 - 3 秒钟延迟+2 秒钟读数, 电位 500 Mv

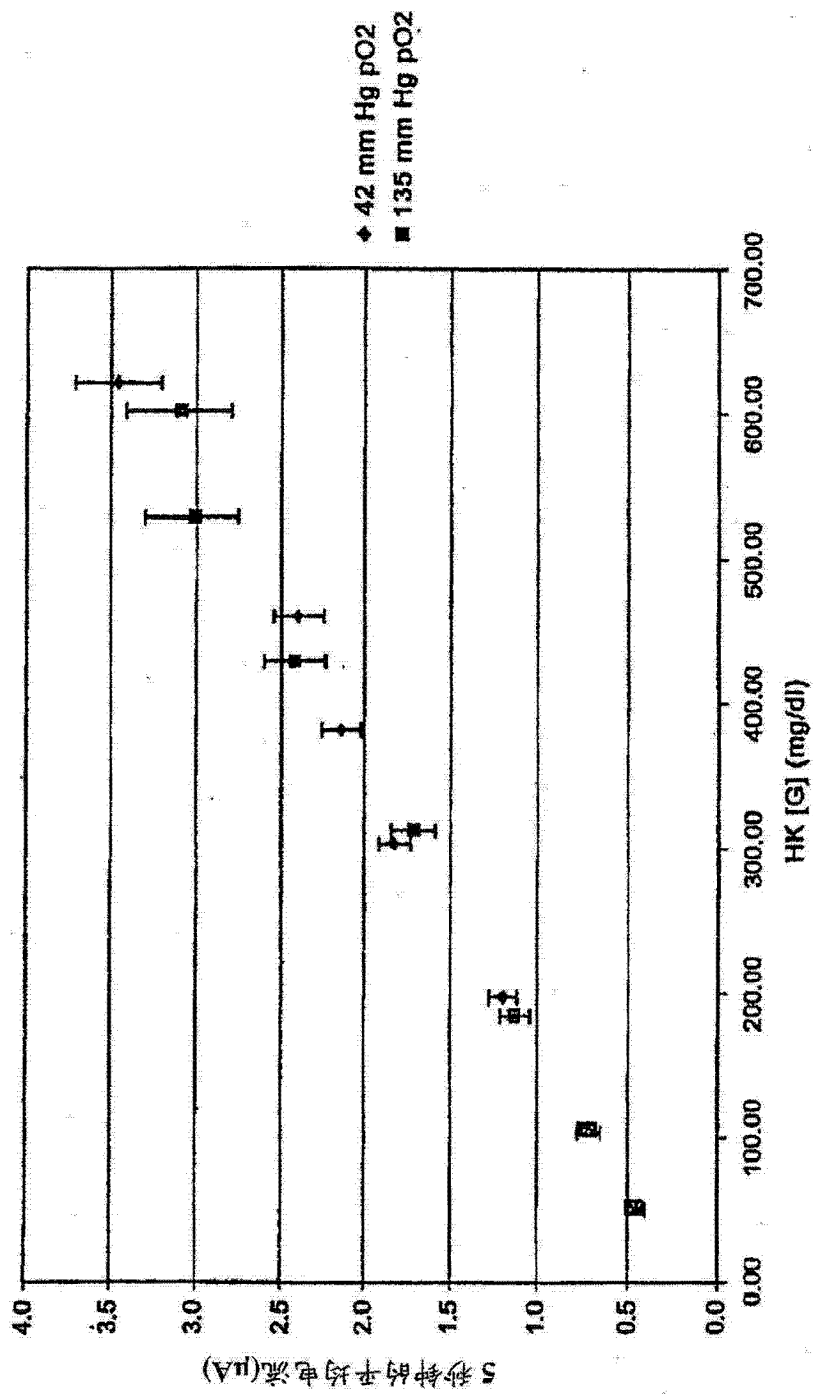


图 5

麦芽糖干扰研究

基质 - 15 μl 葡萄糖脱氢酶、2 mM 吩嗪 III ($\text{R}^1=\text{OH}$, $n=3$)、35 nM NAD 和
4 mM 亚硝基苯胺 VII

测试条件 - 2.5 秒钟延迟+2.5 秒钟读数, 电位 500 mV

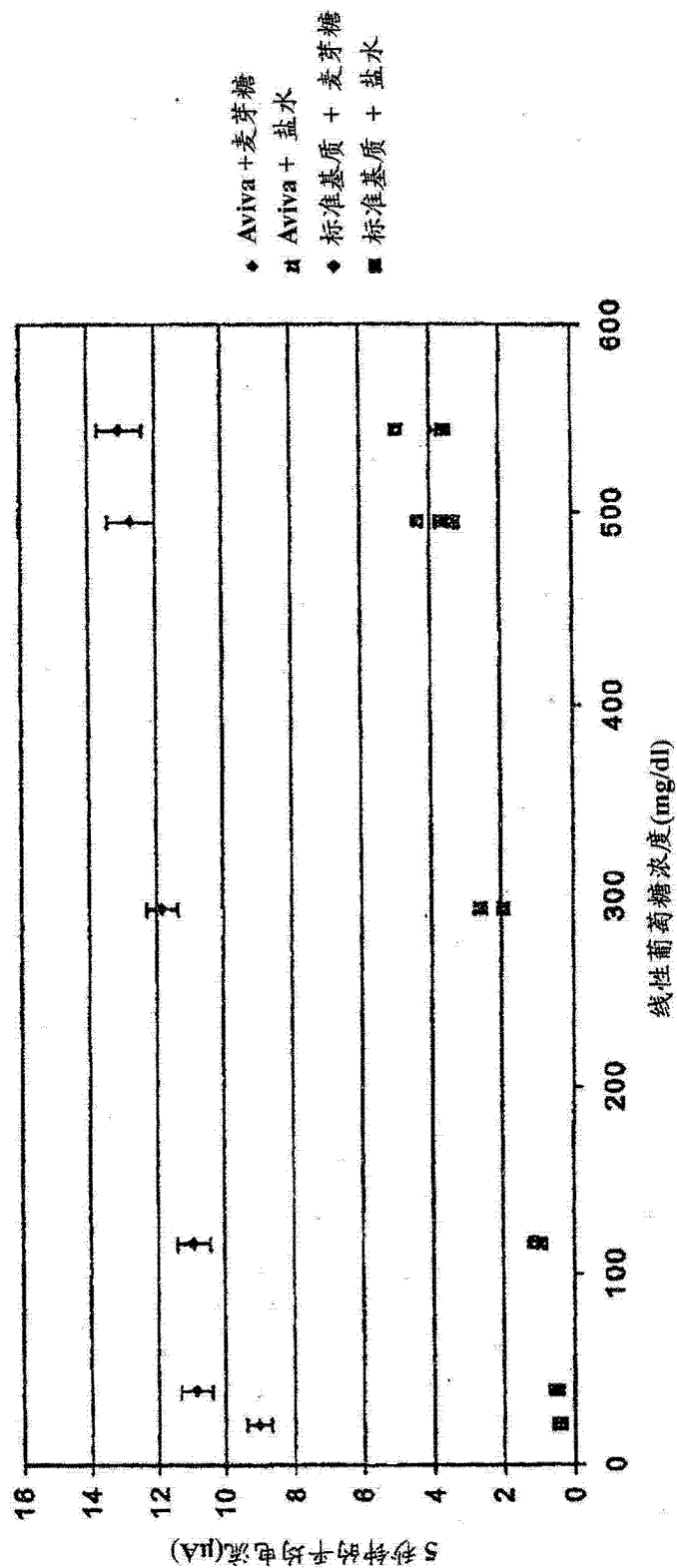


图 6