

公告本

A4
C4

申請日期	88.7.19
案 號	88112217
類 別	G01N33/50, G01N 33/72

(以上各欄由本局填註)

554171

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	供血液樣品測量血紅蛋白及測定白血球用之 試劑
	英 文	<u>Reagent for measurement of the haemoglobin and determination of the leukocytes in a blood sample</u>
二、發明 創作人	姓 名	(1)西爾維·維里亞克 (2)亨利·錢普塞克斯
	國 籍	法 國
	住、居所	(1)法國蒙彼利埃市蒙西爾特斯特路511號 (2)法國蒙特費里爾市坎貝斯路2號
三、申請人	姓 名 (名稱)	ABX公司 (ABX)
	國 籍	法 國
	住、居所 (事務所)	法國蒙彼利埃市卡迪塞路特別遞送企業郵區四
	代 表 人 姓 名	瓊-愛德華·羅貝爾

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6

B6

本案已向：

法國(地區) 申請專利，申請日期：1998-8-4 案號：9810010 ，有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明屬於血液學研究分析研究範圍。

更進一步說明，本發明為供血液樣品測量血紅蛋白及測定白血球之試劑。

測量血紅蛋白濃度及測定白血球，尤其是白血球亞族群(leukocytic sub-population)，在人類醫學及獸醫學之特定病理診斷上，是初期重要根據。

血紅蛋白是血液中被包含在紅血球裡的一種色素蛋白質。

因此測量血紅蛋白濃度前需以細胞溶解試劑使紅血球溶解，待釋放出所包含的血紅蛋白質再進行測量。

為此，已知含有氟離子的試劑可使紅血球溶解並使血紅蛋白質形成穩定的色素原化合物，並藉由比色法而得以測定血紅蛋白質。US專利3874852特別提出此類型試劑。此類型試劑的主要缺點為其內含氟化合物。除此之外，此類試劑無法鑑定及量化待測血液樣品中所含之白血球亞族群。

實際上分析鑑定白血球亞族群，尤其是淋巴細胞(lymphocytes)，單核白血球(monocytes)，嗜中性白血球(neutrophil)及嗜酸性白血球(eosinophil)是判定特定病理的初期重要依據。

目前已有多種不含氟化合物的試劑被提出以供血液試樣檢測白血球。

此類試劑之例子可見於EP 0325710文件中。

然而這類具有不含氟優點之試劑仍有其缺點，即其無法完全準確測定及測量出血液中之白血球亞族群。

比方說EP0325710所提出的試劑可以檢測血液樣品中的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(2)

嗜酸性白血球，但卻無法準確鑑定其它各個種類的白血球亞族群。

此外，EP0424871所提試劑則可分辨白血球亞族群。但是此類試劑有時無法克服在人類病理學及獸醫生物學研究中常遇到的膜抗性(membranous resistance)。

本發明主旨即在於減少前述缺點。

本發明之重點特別是在於提出一種供血液學研究分析之試劑，其可供血液樣品測量血紅蛋白及測定白血球，特別是在不使用氰化合物情況下可溶解紅血球並測量血紅蛋白。

本發明主旨亦在提出此種類型試劑，其可測量白血球之總量、鑑定至少一白血球亞族群及定量至少一白血球亞族群。

本發明主旨亦在提出一種可同時運用於人類醫學與獸醫學研究中的此種類型試劑。

本發明之主旨亦在提出一種可以減低在人類病理學及獸醫生物學中常遇到的膜抗性(membrane resistance)相間之分析問題的試劑。

根據本發明主旨，在此提出符合以上要求之試劑，其包含：

- 至少一陽離子型態的清潔劑；
- 一醇苷類化合物，特別是皂素；
- 至少一無機鹽類，及/或一種調節滲透壓及/或白血球保護劑；
- 一種有機及/或無機緩衝液，其可選擇性地調整試劑之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(3)

pH值至實質中性(pH值介於5至8)，或是鹼性(pH值介於8至12)。

由是，本發明血液試劑包含了至少四種主要成分以達前述發明主旨要求。

陽離子型態的清潔劑可溶解紅血球，以釋放出其內含的血紅蛋白質，而可接續吸光度測量來測定。

離子性(陰離子或陽離子)清潔劑主要是使蛋白質複合物解離並溶解細胞膜上的蛋白質。這種作用稱為變性。

除此之外，它們對於血液中的細胞族群(紅血球與白血球)的作用極快且為非專一性。

醣苷類化合物，特別像是皂素，是專門用來溶解紅血球的成分。另外，醣苷成分亦提高血紅蛋白質之穩定性，以便稍後以特定波長進行分析；而其最特別之處則在於其可破壞紅血球的膜抗性。

皂素，即皂苷，是一種特定具有溶解紅血球能力的醣苷，但是其溶解速度不如加入離子性清潔劑後的溶解速度。當皂素與其他清潔劑一起施用時可以增快並更特定溶解紅血球，而減少對白血球的破壞。

由於此類化合物化學結構之多環碳架構特色，在物理、化學因素上可穩定血紅蛋白氧化衍生物結構。

無機鹽類的加入會影響清潔劑活性。但為了增加電阻以便測量仍必須加入無機鹽類。

調節滲透壓成分主要扮演保護白血球之角色，當在中性pH值環境中施用試劑時，可幫助分辨白血球亞族群。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

最後，緩衝液為試劑的關鍵成分，因為pH值為試劑的重要特徵。事實上，根據不同pH值該試劑可測定一種或多種白血球亞族群。

當試劑pH值被調整至中性(pH值介於5~8)時，便可測量及測定以下三種白血球亞族群：淋巴細胞、單核白血球及嗜中性白血球。

而當pH值被調至鹼性(pH值介於8~12)時，試劑便可測定多核嗜酸性白血球(polynuclear eosinophils)。

因此，為使試劑能夠測定多核嗜酸性白血球，其pH值必須調整至鹼性pH值。

當血液測試項目中不需測定多核嗜酸性白血球，就僅需將試劑pH值調整至實質中性pH值。

本發明試劑中，清潔劑成分較優選自下列物質：

- 一級胺(primary amine)、脂肪胺的乙酸酯類及氫氨酸酯類；
- 四級結構銨鹽及三甲基銨之溴化物；
- 被取代二胺的鹽胺，其被以下物質陽離子化：硫化乙酯、二乙醇胺丙胺、二乙基胺丙胺；及
- 含環的二伸乙基三胺之鹽胺。

清潔劑之濃度介於0至50g/L為有利測試環境，特別是接近18g/L之濃度。

試劑中醴苷類化合物較佳為選擇皂素，亦即皂苷(saponoside)，為較好選擇，也可如三萜烯類(triterpenic)或類固醇類(steroidal)醴苷亦可使用。

五、發明說明 (5)

根據本發明試劑，醣苷類化合物較佳為在 0.5 至 20 g/L 的濃度，而更佳為近 2 g/L 之濃度。

無機鹽成分較佳選自下列化合物質中：鈉或鉀之氯、硫或氟化物。

無機鹽濃度較佳在介於 1 至 15 g/L 濃度之間更佳為接近 8 g/L 之濃度。

本發明試劑之調節滲透壓及 / 或白血球保護劑較佳選自：甘露糖醇，D-葡萄糖及相似性質化合物。

此類調節滲透壓及 / 或白血球保護劑在試劑中的濃度較佳為 0 至 30 g/L，更佳為約 2.5 g/L。

有機及 / 或無機緩衝液較佳選自下列化合物：

三乙醇胺；

磷酸氫化鈉及鉀；

N-[乙醯胺基]-2-亞胺二乙酸；

N-[胺甲醯基甲基]-亞胺二乙酸；

2-胺-2-甲基-1,3-丙二醇；

甘胺酸；

碳酸鈉；

檸檬酸；

三(羥甲基)胺甲烷。

這類緩衝液的合適濃度需介於 0~2 wt.%(重量百分比)

本發明第一個列舉的具體範例，乃以緩衝液調整試劑 pH 值介於 5 至 8。

另一具體範例中，則以緩衝液調整試劑 pH 值介於 8 至 12。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

分析 1(圖 1)

LYM: 3956細胞	53.23%
MO: 420細胞	5.65%
GRA: 2576細胞	34.65%
EOS: 481細胞	6.47%

分析 2(圖 2)

LYM: 1071細胞	9.34%
MO: 805細胞	7.00%
GRA: 8906細胞	77.52%
EOS: 706細胞	6.14%

因此，本發明試劑可以同時測定及測量以上四種白血球亞族群。

實施例 2

使用在本發明實施例 1 中之試劑，針對兩份人類血液樣品進行相似分析。以 ABX 公司出品 ABX-Vega 血液自動分析儀器測量。

結果如圖 3 及圖 4。

圖 3 結果顯示，此種分析方法可以測定及測量下列四種白血球亞族群：淋巴細胞 (LYM)，單核白血球 (MO)，粒細胞 (GRA)，及多核嗜酸性白血球 (EOS)。後者佔了總族群的 5%。

由圖 4 對應的樣品，可測定及測量出以下三種白血球亞族群：淋巴細胞 (LYM)，單核白血球 (MO) 及粒細胞 (GRA)。

圖中並顯示此樣品未含多核嗜酸性白血球 (0%)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

實施例 3

使用如實施例 1 及範例 2 中相似之試劑，但須特別調整 pH 至中性，如 7.6。取一人類血液樣品進行相似的分析。以 ABX 公司出品之 ABX-Vega 自動分析儀器測量分析。

結果見於圖 5。僅偵測到三種主要白血球亞族群：淋巴細胞 (LYM)，單核白血球 (MO) 及粒細胞 (GRA)。

實施例 4

使用相似於實施例 3 中所使用的試劑，其 pH 值調為中性。並取一人類血液樣品進行以上相似之分析。以 ABX 公司出品之 ABX-Vega 自動分析儀器測量分析。

分析結果見於圖 6。如實施例 3 般，僅偵測到下列三種主要白血球亞族群：淋巴細胞 (LYM)，單核白血球 (MO) 及粒細胞 (GRA)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

【圖式簡單說明】

圖 1 為利用法國 ABX 公司血液學研究自動分析裝置 (ABX-Micros) 進行血液學分析之結果，其中係根據相對密度顯示白血球種類之數目。

圖 2 為採用不同於圖 1 之動物血液樣本之血液學分析結果。

圖 3 為人類血液樣本之分析結果，其中顯示出不同的白血球亞族群：LYM、MO、GRA 及 EOS。

圖 4 為不同於圖 3 之人類血液樣本之分析結果，其中顯示出不同的白血球亞族群：LYM、MO、GRA 及 EOS。

圖 5 為人類血液樣本之分析結果，其中顯示出不同的白血球亞族群：LYM、MO 及 GRA。

圖 6 為不同於圖 5 之人類血液樣本之分析結果，其中顯示出不同的白血球亞族群：LYM、MO 及 GRA。

四、中文發明摘要(發明之名稱： 供血液樣品測量血紅蛋白及測定白血球用之試劑)

本發明乃提出一種試劑，其可供血液樣品測量血紅蛋白及測定白血球之用途。此種試劑包含了至少一陽離子性清潔劑；一種醣苷類化合物，特別像是皂素；至少一無機鹽類包括及或是一種調節滲透壓及或是白血球保護劑；可選擇性調整 pH 值之有機或無機緩衝液，其被調整為實質為中性 pH 值 (pH 值介於 5 及 8)，或是鹼性 pH 值 (pH 值介於 8 及 12)。本發明試劑可應用於人類或其他動物醫學研究中的血液分析。

英文發明摘要(發明之名稱：)

Reagent for measurement of the haemoglobin and determination of the leukocytes in a blood sample

The invention relates to a reagent for measurement of the haemoglobin and determination of the leukocytes in a blood sample. This reagent comprises at least one detergent of the cationic type; a compound of the glycoside type, and in particular a saponin; at least one inorganic salt and/or an osmotic and/or leuco-protective agent; and an organic and/or inorganic buffer which can adjust the pH of the agent selectively, either to a substantially neutral value (pH between 5 and 8), or to a basic value (pH between 8 and 12). Application to haematological analyses in human and veterinary medicine.

88112217

公告本

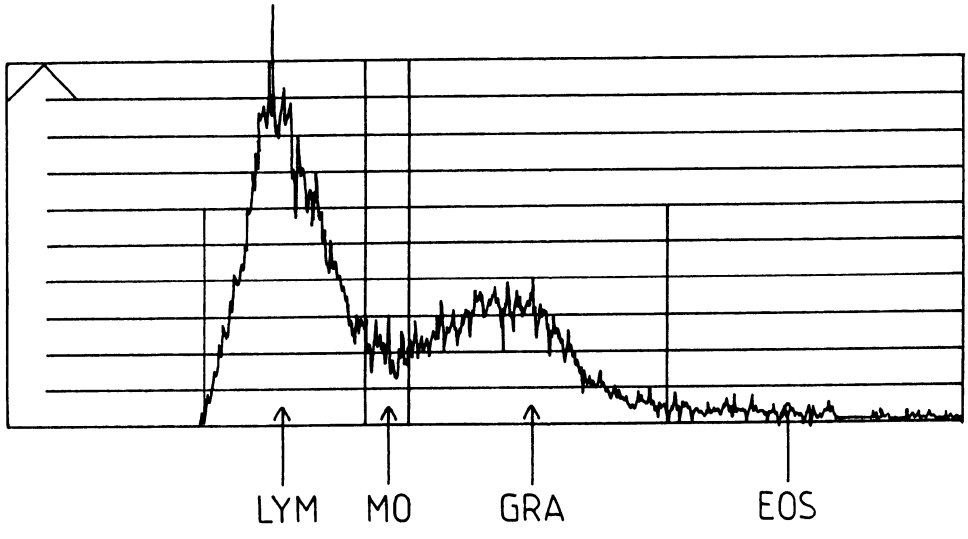


圖 1

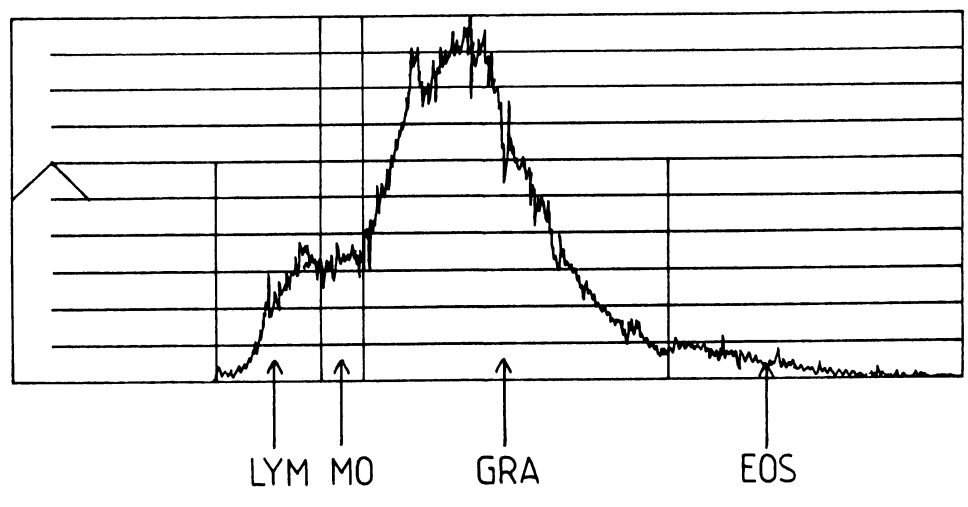


圖 2

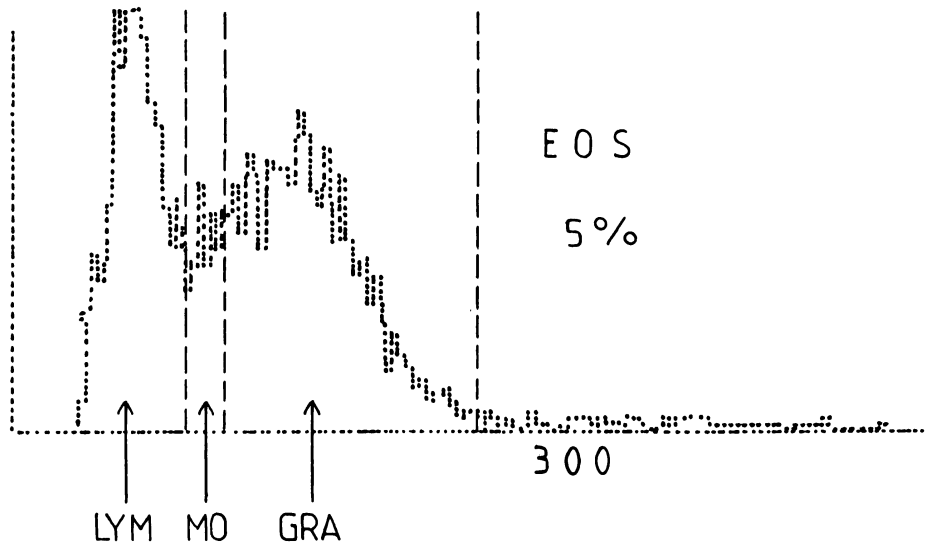


圖 3

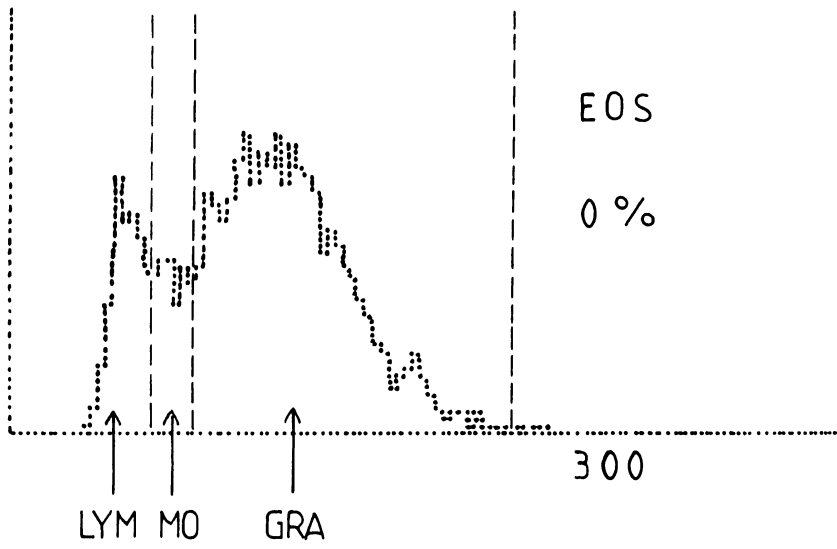


圖 4

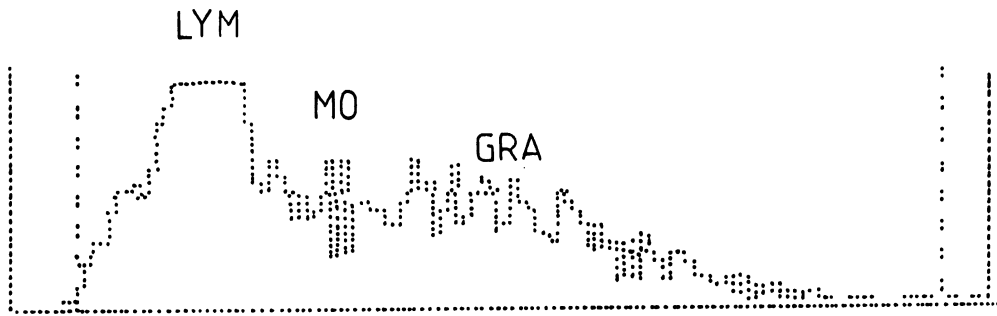


圖 5

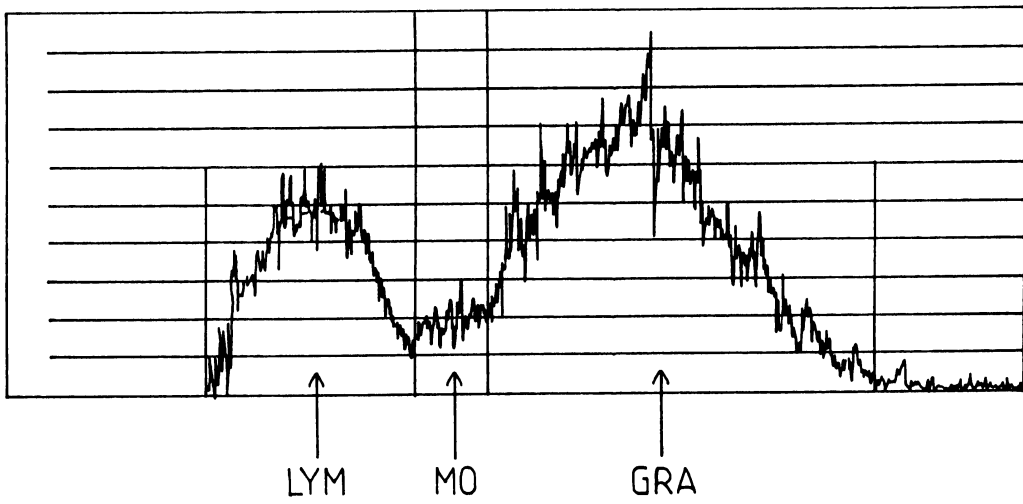


圖 6

現在以下列非限定性之範例說明本發明內容。

實施例 1

茲以下列化合物及其所指定濃度製備一試劑：

成分物質	濃度
氯化鈉	154 mM
C ₁₅ H ₃₄ NCl(陽離子性清潔劑)	45.5 mM
三萜烯類皂素	2 g/L
碳酸鈉(緩衝液)	19 mM

混合以上化合物，並將 pH 值調整至介於 8 及 12，例如 10.5。

製備完成試劑之後，再以法國公司 ABX 所生產血液學研究自動化分析裝置(ABX-Micros)進行兩項血液學研究分析。

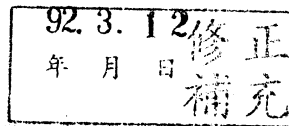
進行此些分析項目時，需先將待分析之特定體積血液樣品、特定體積之稀釋劑及前所配置試劑預先混合。

在範例中，乃針對動物血液進行分析。在兩種不同血樣本的分析結果於圖 1 及圖 2 中呈現。

圖中根據相對密度顯示白血球種類之數目。在圖中可以發現四種白血球亞族群。

這些圖顯示電阻分析結果，由左至右可看出分析中出現的白血球亞族群，依箭頭界分可看出：淋巴細胞(LYM)，單核白血球(MO)，粒細胞 granulocyte(GRA)，及多核嗜酸性白血球(EOS)。

利用自動分析裝置測知的分析結果中包括了每種白血球亞族群細胞數目以及其對應的百分比。



92.3.12
替換本

1. 一種供血液樣品測量血紅蛋白及測定白血球的試劑，

其特徵為包含：

- 至少一陽離子性之清潔劑；
- 一醣苷類化合物；
- 至少一無機鹽類及/或一種調節滲透壓物質及/或白血

球保護劑；

- 一有機及/或無機緩衝液，其可選擇性地調整試劑之 pH 值，至中性狀態 (pH 值介於 5 及 8)，或是鹼性狀態 (pH 值介於 8 及 12)，

其中清潔劑乃選自下列成分：

- 一級胺、脂肪胺的乙酸酯類及氫氨酸酯類；
- 四級結構銨鹽及三甲基酮銨之溴化物；
- 被取代二胺的醯胺，其被以下物質陽離子化：硫化乙酯，二乙醇胺丙胺，二乙基胺丙胺；及
- 含環的二伸乙基三胺之醯胺，

其中醣苷類化合物乃選自皂素(或皂苷)類物質。

2. 如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中內含之清潔劑濃度為介於 0 至 50g/L。

3. 如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中醣苷類化合物濃度為介於 0.5 至 20g/L。

4. 如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中無機鹽類乃選自下列化合物：鈉或鉀之氯化物、硫化物或氟化物。

5. 如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中無機鹽濃度為介

於 1 至 15g/L。

6.如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中調節滲透壓及 / 或白血球保護劑乃選自甘露糖醇，D-葡萄糖及其他相似成分。

7.如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中調節滲透壓及 / 或白血球保護劑濃度為介於 0 至 30g/L。

8.如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中有機及 / 或無機緩衝液成分乃選自下列化合物：

三乙醇胺；

磷酸氫化鈉及鉀；

N-[乙醯胺基]-2-亞胺二乙酸；

N-[胺甲醯基甲基]-亞胺二乙酸；

2-胺-2-甲基-1,3-丙二醇；

甘胺酸；

碳酸鈉；

檸檬酸；及

三(羥甲基)胺甲烷。

9.如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中有機及 / 或無機緩衝液濃度為介於 0 至 2 重量百分比。

10.如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中緩衝液調整後之 pH 值介於 5 及 8。

11.如申請專利範圍第 1 項之試劑，其中緩衝液調整後之 pH 值介於 8 及 12。