

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101598727 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200910054558. 7

EP 1806579 A1, 2007. 07. 11, 全文 .

(22) 申请日 2009. 07. 09

审查员 杨冀川

(73) 专利权人 上海科华生物工程股份有限公司
地址 200233 上海市钦州北路 1189 号

(72) 发明人 宁绍华 朱世成 王缦

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
31200

代理人 陆飞 盛志范

(51) Int. Cl.

G01N 33/52 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0475692 A1, 1992. 03. 18, 全文 .

CN 201181295 Y, 2009. 01. 14, 全文 .

EP 0322669 A1, 1989. 07. 05, 全文 .

US 3992158 A, 1976. 11. 16, 全文 .

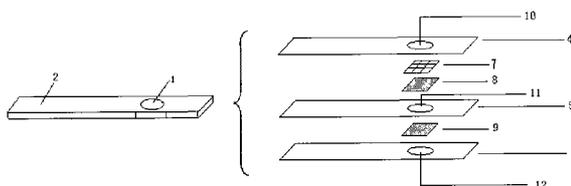
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸

(57) 摘要

本发明属于体外临床诊断试剂技术领域, 具体为一种定量测定人体血液中尿素含量的干化学试纸。试纸由上中下三支持层以及各测试层组成, 可分为手持区和测试区。测试区从上至下依次为扩散层、试剂层和显色剂层。上支持层上开一加样孔, 测试样本从加样孔进入扩散层后渗透至试剂层, 在试剂层发生酶促反应, 由尿素酶催化尿素生成氨气, 在碱性环境下, 反应生成的氨气扩散至显色层与氨气指示剂发生显色反应。通过下支持层的测试孔可由反射式分光光度计测定显色层的光密度变化。该试纸条用于定量测定人体血液中尿素的含量, 为肾功能的诊断提供依据, 适合医院急诊室推广使用。



1. 一种定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,为长形条,其一端为测试区(1),另一端为手持端(2),其特征在于由上支持层(4)、中支持层(5)、下支持层(6)组成;其中,上支持层(4)、中支持层(5)和下支持层(6)通过自带的胶层黏合在一起;在上支持层(4)的测试区开有加样孔(10),中支持层(5)和下支持层(6)相应位置分别开有通气孔(11)和测试孔(12);加样孔和测试孔之间有扩散层(7)、试剂层(8)和显色层(9);扩散层(7)和试剂层(8)叠合,位于上支持层(4)和中支持层(5)之间;显色层(9)位于中支持层(5)和下支持层(6)之间;试剂层(8)含有反应所需的试剂,该试剂主要包括缓冲体系、尿素酶、酶稳定剂;其中缓冲体系为 Tris-HCL 或磷酸盐缓冲液,浓度为 0.02 ~ 0.5M, pH 值为 7.5 ~ 9.5;尿素酶浓度为 20ku/L ~ 200ku/L;酶稳定剂为海藻糖,重量浓度为 0.2% ~ 2.0%;显色层(9)的试剂为下述一种或多种 pH 指示剂:溴酚蓝、溴甲酚绿、溴甲酚紫、溴百里酚蓝,重量浓度为 0.5% ~ 10%。

2. 根据权利要求 1 所述的定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,其特征在于上支持层(1)上覆盖有一层等宽的塑料膜片(3),塑料膜片(3)上附有胶层,用以粘附于上支持层(1)上。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,其特征在于所述的扩散层(7)和试剂层(8)之间还设有用以过滤全血的过滤层。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,其特征在于所述的上、中、下支持层材料为合成纤维材料,每层厚度为 50 ~ 300 μ m,宽度为 5 ~ 14mm,长度为 15 ~ 25mm;所述加样孔(10)、通气孔(11)和测试孔(12)为圆孔,直径为 4 ~ 8mm。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,其特征在于所述扩散层(7)的材料为合成纤维、无纺布、玻璃纤维、尼龙膜或滤纸。

6. 根据权利要求 1、2 之一所述的定量测定人体尿素含量的干化学试纸,其特征在于所述的扩散层(7)采用网布形式。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,其特征在于所述的试剂层(8)的材料为合成膜、滤纸、纤维织物或无纺布。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,其特征在于所述的显色层(9)的材料为合成膜、滤纸、纤维织物或无纺布。

定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸

技术领域

[0001] 本发明属于体外临床诊断试剂技术领域,具体涉及一种适用于定量测定人体血液中尿素含量的干化学试纸。

背景技术

[0002] 尿素是人体蛋白质代谢的终末产物,体内氨基酸经脱氨基作用分解成 α -酮酸和 NH_3 , NH_3 在肝细胞内进入尿素循环与 CO_2 生成尿素。肝脏是生成尿素的最主要器官。尿素的生成量取决于饮食中蛋白质摄入量、组织蛋白质分解代谢以及肝功能情况。肝脏中生成的尿素主要经肾脏排泄,小部分经汗液排出。它主要是经肾小球滤过,并随尿液排出体外。如果肾功能受到损害,肾小球滤过率降低,血液中尿素浓度就会增加。

[0003] 血液中尿素含量是肾功能最重要的观测指标之一,是临床常规和急诊不可缺少的检测项目。用于诊断某些肾脏疾病和代谢紊乱疾病。

[0004] 尿素的测定方法长期以来采用传统的湿化学方法,如二乙酰一胍法、脲酶-吲哚酚法、脲酶-脯氨酸脱氨酶偶联法等。这些方法有足够的准确度和精密度,但需昂贵的仪器和专业技术人才,并且操作繁琐、不能快速测定出结果,不适合医院急诊室的需求。干化学试剂以其操作简便、测定快速、灵活以及无需专业人才等优点很好的补充了湿化学法的不足之处,其测定准确度和精密度已经接近湿化学测定方法,广泛被医院急诊室所采用。

[0005] 目前,医院急诊生化测试所使用的均为进口干化学产品,按照其产品结构上的差异可以分为两类:

[0006] 第一类是以强生和富士为代表的采用涂层技术的干化学试剂。强生和富士是将胶卷生产领域中的涂层技术运用到了临床诊断领域,将测定反应中所需的各种试剂按照反应的先后次序自下向上分别均匀的分层涂布在透明塑料薄片上。以尿素测定干片为例,从上往下依次分别为扩散层、光漫射层、酶试剂层、半透膜层以及显色剂层。最终通过仪器测定显色层光信号的变化到达定量测定的目的。该技术起源于上世纪 70 年代初,由 Eastman 有机化学制品公司和 Kodak 公司合力开发(现在所属 Johnson&Johnson)。二者分别利用各自在化学试剂和涂层技术领域的特长,历经数年的研究开发,先后成功开发了葡萄糖、尿素以及尿酸测试干片, U. S. Pat 3992158 详细阐述了其测试干片的形式、结构、测试原理以及加工过程等等,于 1980 年开发出干片测试仪器 Eastman Kodak Ektachem400,最终于 1981 年将 12 个测试干片项目推向市场。目前为止, Johnson&Johnson 先后推出 Vitros 250 分析仪、Vitros 950 等干式生化分析仪,测试项目已经多达 30 余个,其中包括了一些免疫测试项目。

[0007] 第二类是以罗氏为代表的干化学产品,其采用横向扩散模式,以各种膜材料为反应载体,比如玻璃纤维或各种织物等。滴加测试样本后,样本横向扩散至测试区域发生反应产生光信号变化。其显著特点在于可以以全血为测定样本,缺点是加样量较大。

[0008] 强生、富士以及罗氏的尿素测试干片或试纸条,其测试原理均是采用了尿素酶法,即利用尿素酶在碱性环境分解尿素后产生氨气,通过指示剂(一种 pH 指示剂)与生成的

氨气发生显色反应,间接的测定出尿素的含量。其不同于其他测试项目的难点在于如何避免测试环节中的碱性成分对指示剂的干扰。强生、富士以及罗氏均是采用了疏水透气层作为解决方案,具体是在试纸层和显色层之间设置一层疏水透气层,作用是可以隔离反应层的碱性成分对显色剂的干扰,同时保证试剂层生成的氨气可以通过疏水透气层扩散至显色层发生反应。由于其区别与其他测试干片的特殊结构,造成了生产工艺上的困难。U. S. Pat7022285B2 揭示了疏水透气层性能的差异直接影响测试结果的精密度,成为了尿素测试干片性能的关键制约因素。

[0009] 以上产品中,有的生产工艺复杂,比如罗氏试纸条;有的需要专门的设备技术,比如强生和富士干片。特别是其试剂价格昂贵,只有在大型医院使用,难以为中小型医院,特别是小型医院所接受,阻碍了干化学产品的普遍应用。而且与之配套使用的干式生化分析仪多为大中型仪器,无论从价格和便携性上均有一定局限性。因此,开发研究小型便携式干式生化分析仪以及价格更为合理的干化学试剂,对于我国中小型医院更具有实际意义,更有利于干化学测定方法在临床诊断中的推广应用。

[0010] 本发明尿素测试试纸条,采用独特的结构,无需疏水透气层,既简化了加工工艺,减低了成本,又减少了疏水透气层对测试的影响。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种使用方便,且可快速定量测定人体血液中尿素含量的干化学试纸条。

[0012] 本发明提供的定量测定人体血液尿素含量的干化学试纸,其为长形条,一端为测试区 1,另一端为手持端 2,如图 1 所示。它由上支持层 4、中支持层 5、下支持层 6、扩散层 7、试剂层 8 和显色层 9 组成,如图 2 所示。其中,在上支持层 4 的测试区开有加样孔 10,在中支持层 5 和下支持层 6 的相应位置分别开有通气孔 11 和测试孔 12;扩散层 7 和试剂层 8 叠合,位于加样孔 10 和通气孔 11 处的上支持层 4 和中支持层 5 之间,显色层 9 位于通气孔 11 和测试孔 12 处的中支持层 5 和下支持层 6 之间;上支持层 4、中支持层 5 和下支持层 6 通过自带的胶层相互黏合在一起,并将相应的扩散层 7、试剂层 8 和显色层 9 粘附固定于所述相应位置。

[0013] 上述结构的干化学试纸,主要用于测定人体血清尿素含量。如果是测定全血样本,则要在上述的扩散层 7 和试剂层 8 之间设置一层过滤层以便滤去红细胞。

[0014] 本发明中,所述的上支持层、中支持层和下支持层材料可采用合成纤维材料,如:聚丙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚乙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯或聚酯纤维等,其中以聚酯材料为最佳。单片厚度为 50 ~ 350 μm ,宽度为 5 ~ 14mm,长度为 15 ~ 50mm。加样孔 10、通气孔 11 和测试孔 12 为圆孔,直径相等,大小为 4 ~ 8mm。加样孔 10 用于滴加测试所用样本;通气孔 11 的作用在于隔离试剂层 8 和显色层 9,避免二者的接触以及在滴加样本后,在试剂层 8 产生的氨气可通过通气孔 11 扩散至显色层 9 发生显色反应;测试孔 12 用于观测和测定显色层颜色的变化。

[0015] 本发明中,扩散层 7 的作用在于其可以将滴加的样本快速均匀的渗透到试剂层 8。适合做扩散层的材料包括各种滤纸、玻璃纤维、无纺布、尼龙膜或合成纤维等,优选合成纤维材料,最合适的材料为聚酯纤维或尼龙纤维材料,其中以网布形式为佳。

[0016] 本发明中,试剂层 8 为反应层。滴加样本后,样本扩散至试剂层 8,固定在试剂层 8 中的尿素酶催化尿素生成 NH_3 和 CO_2 ,在碱性环境下,生成的 NH_3 从试剂层 8 释放出来,经通气孔 11 扩散至显色层与显色剂发生显色反应。适合做试剂层的材料有各种滤纸、无纺布、合成膜以及纤维织物等,孔径大小为 $0.2 \sim 15 \mu\text{m}$ 。本发明中,显色层 9 涂布有可以与 NH_3 发生显色反应的显色剂,该显色剂包括下述一种或多种 pH 指示剂:溴酚蓝、溴甲酚绿、溴甲酚紫或溴百里酚蓝等。显色剂的重量浓度为 $0.5\% \sim 10\%$ 。适合做显色层的材料包括合成膜、滤纸、纤维织物或无纺布等。优选带有塑料背衬的合成膜材料。也可将显色剂直接涂布于薄膜片上。本发明中,试剂层 7 中的试剂包括缓冲体系、尿素酶、和酶稳定剂等。其中缓冲体系为 Tris-HCl 或磷酸盐缓冲液,浓度为 $0.02 \sim 0.5\text{M}$,pH 值为 $7.5 \sim 9.5$;尿素酶浓度为 $20\text{ku/L} \sim 200\text{ku/L}$;酶稳定剂为双糖类、多糖类或牛血清白蛋白,重量浓度为 $0.2\% \sim 2.0\%$ 。

[0017] 本发明提出的定量测定人体尿素含量的干化学试纸,可用于测试通过反应能够产生氨气的化学成分,如:肌酐、血氨等等,不同之处在于试剂层成分的特有差异,测试时,测试样本从加样孔进入扩散层后渗透至试剂层,在试剂层发生酶促反应,由尿素酶催化尿素生成氨气,在碱性环境下,反应生成的氨气扩散至显色层与氨气指示剂发生显色反应。通过下支持层的测试孔可由反射式分光光度计测定显色层的光密度变化。该试纸条用于定量测定人体血液中尿素的含量,为肾功能的诊断提供依据,适合医院急诊室推广使用。

[0018] 为定量测定血液中尿素含量,发明人还研制了反射式分光光度计(另案申请专利),与本发明干化学试纸条配套使用。该仪器可以将反应温度控制在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$,测定波长为 630nm ,达到反应时间后,仪器自动读取反射光密度,并通过内置的标准曲线将光信号转化为尿素浓度,自动报告和储存测试结果,并可打印。

附图说明

[0019] 图 1 为本发明的干化学试纸结构图示。

[0020] 图 2 为本发明的干化学试纸结构解析图。

[0021] 图 3 为本发明的干化学试纸图示。其中,(A) 为加样前,(B) 为加样后。

[0022] 图中标号:1 为测试区,2 为手持区,3 为塑料膜片,4 为上支持层,5 为中支持层,6 为下支持层,7 为扩散层,8 为试剂层,9 为显色层,10 为加样孔,11 为透气孔,12 为测试孔。

具体实施方式

[0023] 实施例:

[0024] 实施例 1:上、中、下支持层材料采用 PVC 材质,厚度分别为 0.14mm 、 0.12mm 、 0.14mm ;长度为 20cm ,宽度为 8cm 。其中上下支持层单面附有粘胶,中支持层双面附有粘胶。分别在一端打出加样孔、通气孔和测试孔,孔直径为 4mm ,孔距为 8mm 。扩散层采用尼龙网布,试剂层采用纤维织物,显色层采用带塑料背衬的硝酸纤维素膜,宽度均为 8mm 。将扩散层、试剂层和显色层分别黏贴到上中下支持层的相应位置,即位于加样孔、通气孔和测试孔处。然后上支持层和中支持层对齐黏合在一起。将配好的酶反应液和显色液分别滴加至试剂层和显色层,酶反应液 $12 \mu\text{l}/\text{孔}$,显色液 $8 \mu\text{l}/\text{孔}$ 。

[0025] 酶反应液试剂的配方如下:

[0026] 尿素酶 20KU/L

[0027] Tris-HCl 0.2mM

[0028] 海藻糖 重量浓度 1%

[0029] 显色剂试剂配方：

[0030] 溴酚蓝 重量浓度 1.5%

[0031] 将喷点后的试纸放入 60℃干燥箱中,60 分钟后取出,将上中支持层和下支持层对齐边缘黏合在一起,用滚刀机其切割成 8mm 宽的试纸条,放入干燥筒。

[0032] 配制不同浓度的尿素标准品,将 10 μ l 标准品滴加于加样孔,用反射式光度计进行测定,读取 3min 处的 OD 值。

[0033]

BUN 浓度 (mg/dl)	OD 值
10	0.2
20	0.42
40	0.68
80	0.97
120	1.22

[0034] 实施例 2:上中下支持层材料采用 PET 材质,厚度分别为 0.12mm、0.15mm、0.12mm;长度为 20cm,宽度为 8cm。其中上下支持层单面附有粘胶,中支持层双面附有粘胶。分别在两端打出加样孔通气孔和测试孔,孔直径为 4mm,孔距为 8mm。扩散层采用聚酯网布,试剂层采用滤纸材料,显色层采用带塑料背衬的硝酸纤维素膜,宽度均为 8mm。将扩散层、试剂层和显色层分别黏贴到上中下支持层的相应位置,即位于加样孔、通气孔和测试孔处。然后上支持层和中支持层对齐黏合在一起。将配好的酶反应液和显色液分别滴加至试剂层和显色层,酶反应液 10 μ l/孔,显色液 10 μ l/孔。

[0035] 酶反应液试剂的配方如下：

[0036] 尿素酶 80KU/L

[0037] Tris-HCl 0.5mM

[0038] 海藻糖 重量浓度 2%

[0039] 显色剂试剂为重量浓度 2%溴酚蓝溶液。

[0040] 将喷点后的试纸放入 60℃干燥箱中,50 分钟后取出,并将上中支持层和下支持层对齐边缘黏合在一起,并用滚刀机其切割成 8mm 宽的试纸条,放入干燥筒。

[0041] 配制不同浓度的尿素标准品,将 5 μ l 标准品滴加于加样孔,用反射式光度计进行测定,读取 3min 处的 OD 值。

[0042]

BUN 浓度 (mg/dl)	OD 值
10	0.23
20	0.49
40	0.76
80	1.24
120	1.64

。

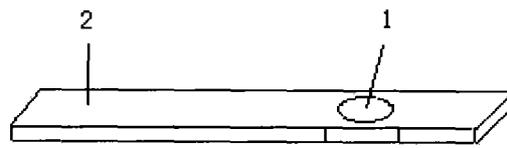


图 1

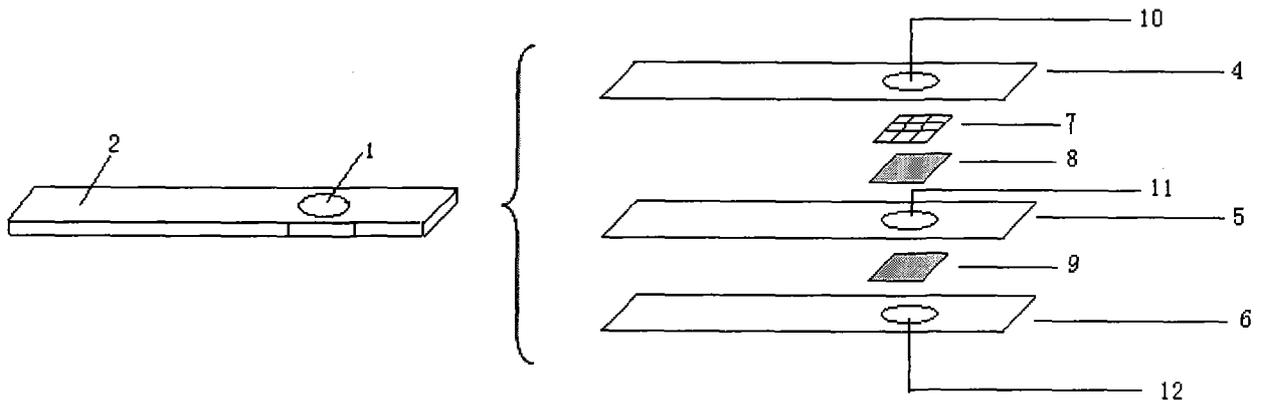


图 2

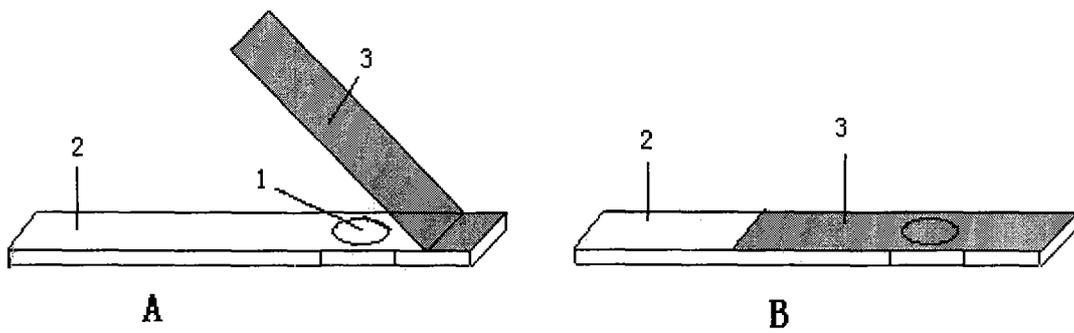


图 3