

申請日期：92-09-16	IPC分類 G01N 33/50
申請案號：92124953	G01N 27/28

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

200413723

一、發明名稱	中文	經介質穩定之試劑組成物及其用於電化學分析物偵測之方法
	英文	Mediator stabilized reagent compositions and methods for their use in electrochemical analyte detection assays
二、發明人 (共5人)	姓名 (中文)	1. 提瑪莉 2. 察羅納 3. 侯艾拉
	姓名 (英文)	1. Maria TEODORCZYK 2. Ronald C. CHATELIER 3. Alastair McIndoe HODGES
	國籍 (中英文)	1. 2. 3.
	住居所 (中文)	1. 美國加州聖約瑟市朗寧春路6014號 2. 澳洲維多利亞市艾格貝路13號 3. 澳洲維多利亞市貝拉南路茉莉巷15號
	住居所 (英文)	1. 6014 Running Springs Rd., San Jose, CA 95135, U.S.A. 2. 13 Apple Grove Bayswater, Victoria 3153, Australia 3. 15 Jasmine Court, Blackburn South, Victoria 3130, Australia
三、申請人 (共1人)	名稱或姓名 (中文)	1. 美商來富肯公司
	名稱或姓名 (英文)	1. LifeScan, Inc.
	國籍 (中英文)	1. 美國 US
	住居所 (營業所) (中文)	1. 美國加州密爾派塔市吉瑞大道1000號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英文)	1. 1000 Gibraltar Drive, Milpitas, CA 95035-6312, U.S.A.
	代表人 (中文)	1. 伯納德
代表人 (英文)	1. Bernard E. Shay	

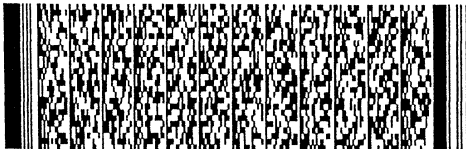


申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	
	英文	
二、 發明人 (共5人)	姓名 (中文)	4. 歐堤姆 5. 戴瑞米
	姓名 (英文)	4. Timothy OHARA 5. Remy DATO
	國籍 (中英文)	4. 5.
	住居所 (中文)	4. 美國加州丹威市艾里路1020號 5. 美國加州普雷斯市葛瑞納路3420號
	住居所 (英文)	4. 1020 Alicante Drive, Danville, CA 94526, U.S.A. 5. 3420 Gravina Place, Pleasanton, CA 94566, U.S.A.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓名 (中文)	
	名稱或 姓名 (英文)	
	國籍 (中英文)	
	住居所 (營業所) (中文)	
	住居所 (營業所) (英文)	
	代表人 (中文)	
	代表人 (英文)	



一、本案已向

國家(地區)申請專利	申請日期	案號	主張專利法第二十四條第一項優先權
美國 US	2002/09/12	10/242, 951	有

二、主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間

日期：

四、有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

無

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

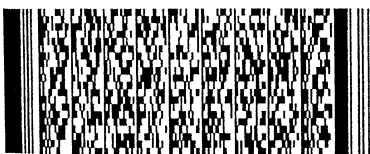
有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

無

寄存號碼：

熟習該項技術者易於獲得, 不須寄存。

五、發明說明 (1)

說 明

發明之領域

本發明之領域為分析物之偵測，其特別指電化學分析物的測定以及更特別指血液分析物的電化學測定。

背 景

例如血液或血液衍生產物之生理液体或樣本的分析物偵測對現今社會而言漸增其重要性。應用於包括臨床實驗室檢查、簡易測定法等各種分析物的偵測試驗在各種的疾病診斷和管理上已扮演重要的角色。分析物包括糖尿病管理上的葡萄糖、膽固醇，及其類似物。基於分析物偵測日漸增加的重要性，已發展出做為臨床及簡易檢查用途的各種分析物偵測方法和裝置。

一種應用於分析物偵測的方法為電化學偵測法。此類方法中，將水性液体樣本置於至少含參考和工作電極兩個電極之電化學室的反應區，其電極所產生的阻抗適合進行電流的測量。使準備分析的成分直接和電極反應，或直接或間接和氧化還原劑反應而形成一種相當於該分析物之濃度的可氧化(或可還原)物質。以電

五、發明說明(2)

化學方法測定該可氧化(或可還原)物質的數量，以及其和最初樣本內存在分析物數量的關係。

許多此類分析物偵測的電化學方法中，應用一種含酵素成分和介質成分的分析物氧化信號產生系統，其酵素成分將標的分析物氧化而傳遞一個電子至介質，亦即傳遞電子至電化學室的電極，因而產生而測量分析物濃度的電流信號。

一般在測試前已預先製造好的電化學測試條。在其製造完成後至使用之前，可先儲存該測試條。在儲存期間，一部分介質會轉變成其還原型式。在此情況下，由於一部分介質已被還原，故當進行測試時可能造成結果上的誤差。

因此，亟需發展出一種可穩定儲存介質的電化學試劑。本發明即可滿足此種需求。

相關的文獻

美國專利文件：5,723,284；5,834,224；5,942,102；5,972,199；5,997,817；6,059,946；6,083,710；6,121,009；6,134,461；6,179,979；6,193,973 和 6,284,125；以及其他專利文件：WO 99/49307；WO 97/18465；WO 01/57510；

五、發明說明 (3)

WO 01/57238 ; WO 02/48707 ; WO 02/50609 ;
EP 0 969 097A2 ; JP091403378A ; 以及 GB 2
304 628 。

發明之概述

提供經介質穩定之試劑組成物及其用於電化學分析物偵測之方法。試劑組成物包括酵素、氧化還原介質和介質穩定緩衝劑。或者，試劑組成物可進一步包括一種或多種濕潤劑、清潔劑、酵素輔因子和其之組合。亦提供含試劑組成物的電化學測試條，以及用於分析物偵測檢查之方法的系統和套組。本發明可有各種不同的應用方法，其包括應用於葡萄糖濃度的檢測。

圖式之簡單說明

圖 1 為根據本發明之一種電化學測試條的分解圖。

圖 2 為呈組合形式上述相同測試條。

圖 3 為根據本發明含檸檬酸鹽、蘋果酸和酒石酸配製物的線性測試結果。

圖 4 和 5 為根據本發明之噴墨檸檬酸鹽和苯六甲酸配製物所顯示之血容比性能的結果。

五、發明說明 (4)

圖 6 和 7 為根據本發明之檸檬酸和檸檬康酸 (citraconic acid) 試劑配製物所顯示之血容比性能的結果。

圖 8 為根據本發明之檸檬康酸和順丁烯二酸試劑配製物的線性測試結果。

圖 9 和 10 為以根據本發明之檸檬康酸鹽和苯六甲酸鹽試劑配製物製成之電化學葡萄糖感測器的穩定性資料。

特定具體例之說明

提供經介質穩定之試劑組成物及其用於電化學分析物偵測之方法。試劑組成物包括酵素、氧化還原介質和介質穩定緩衝劑。或者，試劑組成物可進一步包括一種或多種濕潤劑、清潔劑、酵素輔因子和其之組合。亦提供含試劑組成物的電化學測試條，以及用於分析物偵測檢查之方法的系統和套組。本發明可有各種不同的應用方法，其包括應用於葡萄糖濃度的檢測。

在進一步說明本發明之前，應瞭解本發明並非僅侷限於下述本發明特定之具體例，因其所述之特定具體例可有不同的變化，並且仍被涵蓋於附錄之專利申請範圍內。亦應瞭解所使

五、發明說明 (5)

用的術語為說明特定具體例之目的，而非其限制。因此，本發明之範圍涵蓋於附錄之專利申請範圍內。

在此專利說明書和附錄專利申請範圍內，除非另有說明否則單數冠詞"a"、"an"及"the"均涵蓋多數之意義。除非另有說明，此處所使用之技術及科學名詞均為熟習本發明技藝之人仕一般瞭解的相同定義。

除非另有明確說明否則介於列舉區間上下限之間的中介值，以及任何其他列舉區間之陳述或中介值均可至小數點以下 1 位數並被涵蓋於本發明的範圍內。此小區間之上限和下限值可獨立被包含於該小區間內，並且除指明不包含於該區間之外亦被涵蓋於本發明的範圍內。陳述區間雖可含上限或下限，但不含上下限或其中之一之區間亦被涵蓋於本發明的範圍內。

除非另有說明，此處所使用之技術及科學名詞均為熟習本發明技藝之人仕一般瞭解的相同定義。雖然本發明可利用類似或相等的方法、裝置和材料，但此處所述則為較佳之法、裝置和材料。

五、發明說明 (6)

所提及的全部說明為解釋所說明及揭示細胞株、向量和方法學之目的，其可能和本發明所揭示的容容有關。

如上述摘要，本發明提供經介質穩定之試劑組成物及其用於電化學分析物偵測之方法的應用。本發明的進一步說明中，先詳細描述本試劑之配製物，接著說明包含本配製物之電化學試劑的測試條，以及利用此測試條電化學偵測樣本內存在的分析物，例如，以定量的方法。最後，亦提供根據本發明之代表性系統和套組的說明。

經介質穩定之試劑組成物

如上述摘要，本發明提供經介質穩定之電化學試劑組成物。本電化學試劑組成物為用於例如測試條之電化學分析物偵測裝置中的組成物，並且一般為氧化還原試劑組成物。經介質穩定之試劑組成物意指在一般儲存環境下經一段時間不會轉變成還原型的介質組成物。一般的儲存環境意指溫度範圍為從約-20至約55°C，一般為從約5至約40°C，以及濕度範圍為從約5至約90%，一般為從約10至約60%。本介質穩定試劑組成物可使試劑穩定儲存約18個月以

五、發明說明 (7)

上。

根據本發明之經介質穩定的電化學試劑組成物包含下列至少一種組成物：酵素、氧化還原介質以及介質穩定緩衝劑。氧化還原試劑組成物可進一步含一種或多種其他組成分，其包括濕潤劑、清潔劑、輔酶，以及其類似物。各種組成物將於下述做更詳細的說明。

酵素成分

在許多具體例中之本試劑組成物的酵素成分為可氧化標的分析物的一種酵素或多種酵素。換言之，酵素為可產生電化學偵測信號的單一分析物氧化酶或兩種或多種氧化標的分析物的一群酵素組合。標的酵素包括氧化酶、脫氫酶、脂肪酶、激酶、心肌黃酶(diaphorases)、喹啉蛋白(quinoproteins)及其類似物。

視電化學測試條內酵素所偵測之特定分析物選擇反應中所需的酵素。具代表性酵素包括：葡萄糖氧化酶、葡萄糖脫氫酶(GDH)、膽固醇酯酶、膽固醇氧化酶、脂蛋白脂肪酶、甘油激酶、3-磷酸甘油氧化酶、乳酸鹽氧化酶、乳酸鹽脫氫酶、丙酮酸氧化酶、乙醇氧化酶、膽紅素氧化酶、尿酸酵素，及其類似物。

五、發明說明(8)

氧化還原介質

試劑組成物的其他成分為氧化還原介質，其可含一種或多種介質。介質做為從酵素(其在分析物氧化作用中從分析物獲得一個或多個電子)傳遞電子至電極的中間物。可使用本技藝中習知的各種介質，其包括亞鐵氰化物、啡啉硫酸乙酯(phenazine ethosulphate)、啡啉硫酸甲酯(phenazine methosulfate)、苯二胺、N,N,N',N'-四甲基苯二胺、1-甲氧基-啡啉硫酸甲酯、2,5-二甲基-1,4-苯醌、2,6-二甲基-1,4-苯醌、2,5-二氯-1,4-苯醌、二亞鐵(ferrocene)衍生物、聯吡啶鐵(osmium bipyridyl)複合物、鈦複合物及其類似物。在許多具體例中，其氧化還原介質為亞鐵氰化物。

介質穩定緩衝成分

試劑組成物的其他成分為介質穩定緩衝成分。可利用一種或例如二、三、四或多種不同緩衝劑製成本介質穩定緩衝成分，該緩衝成分在儲存期間可穩定乾燥組成物之介質，而能在使用前僅極少介質被氧化。儲存期間在緩衝劑存在下僅極少介質被轉變成還原型，則緩衝劑視為對該介質具有穩定作用。適合的緩衝劑不

五、發明說明 (9)

會在長時間如下述說明於實驗部分的電化學測定中產生背景信號。背景信號為電化學測定系統中以不含分析物之樣本進行測定時所產生的信號。

混合樣本之試劑組成物的液体反應混合物中的緩衝劑成分可使反應混合物的 pH 值維持在可接受範圍，在許多具體例中緩衝成分可使反應混合物的 pH 值維持在約 4.0 至 8.0 的範圍內，例如，從約 5.0 至約 7.5，較佳為從約 5.5 至約 7.0。

緩衝成分的一種或多種緩衝劑具有可使上述以本試劑配製物製成之反應混合物維持在所述 pH 值範圍內的 pKa。適合的緩衝劑一般具有約 4 至約 8 的 pKa 值，例如，從約 4.5 至約 7.5，其包括從約 5.0 至 7.0 以及從約 5.5 至 7.0。某種類型的緩衝劑可具有超過一種以上的 pKa 值，並且此類緩衝劑祇要其所含的一種緩衝劑之 pKa 值落於上述範圍內時即適合做為本發明之緩衝劑。

應用於本試劑組成分之緩衝劑必需對例如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等之雙價金屬陽離子具有極低的親和力，因此，其極不易和雙價金屬陽離子形成多

五、發明說明 (10)

牙配位結合之複合物。一緩衝劑和雙價金屬陽離子的親和力若低於該反應混合物內任何酵素/輔酶複合物和相同雙價金屬陽離子的親和力則該緩衝劑被視為具有低親和力，適合的緩衝劑其親和力一般至少低於該反應混合物內任何酵素/輔酶和相同雙價金屬陽離子之親和力的 2 倍，通常至少低於約 5 倍，以及更常見為至少低於約 10 倍，例如，25 倍或 50 倍。利用 *Annali di Chimica*，第 73 卷(1983)第 619 頁中所述方法測定適當緩衝劑結合特別是 Ca^{2+} 的雙價金屬陽離子之複合物作用的穩定常數一般不超過約 1500，通常不超過約 100，以及更不常超過約 5 莫耳⁻¹分米³。

在某具體例中，其緩衝劑為細小有機分子。所謂細小意指該緩衝劑之分子量不超過約 5,000 道耳頓，以及一般不超過約 2,500 道耳頓或者更常見者為不超過約 1,000 道耳頓，其中許多具體例中之緩衝劑的分子量約介於 50 至 750 道耳頓，例如，從約 75 至 500 道耳頓。

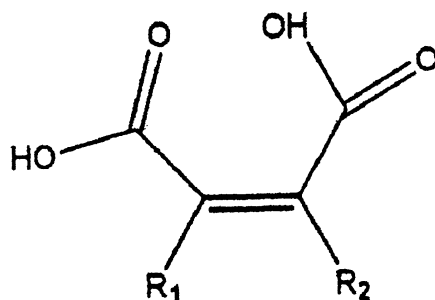
在一具體例中，其緩衝劑為聚羧酸。聚羧酸意指該緩衝劑含兩個或多個羧酸功能部分，不同羧酸功能部分的數目可從約 2 至約 10，例

五、發明說明 (11)

如，從約 2 至約 8，其包括從約 2 至約 6。本緩衝劑之羧酸基或功能部分可附著於許多不同的構造，包括脂族、脂環族、芳族及雜環的構造。存在一種以上之羧酸基的優點為可提供至少一種在所需範圍內之緩衝劑的 pKa 值。

在許多具體例中，本聚羧酸緩衝劑之兩種或多種羧酸基所構成的立體方位可阻礙和例如 Ca^{2+} 及其類似物之雙價金屬離子的多牙配位結合。例如，在一穩定主幹上具有兩個或多個以順式連鎖之羧酸基的緩衝劑可箝制該順式基之相互間的移動，例如，位於乙烯主幹上等，而該穩定主幹可為例如芳族環等之較大構造的一部分。

在某些具體例中，其緩衝劑可為下式：



其中 R_1 和 R_2 獨立為氫或一個或多個碳原子的有機部分，其可為直鏈或支鏈及被一個或多個雜原子所取代， R_1 和 R_2 可形成環狀構造，例

五、發明說明 (12)

如，一種芳族環構造，及其類似物。

上述之緩衝劑可能以其游離酸或鹽類或兩者的型式存在於本試劑的配製物內。

本緩衝劑成分的特性為提供以此緩衝劑構成之試劑具有如上述之穩定介質的能力。在本試劑配製物的液体組成物中，緩衝成分的濃度一般為從約 0.1 至約 1,000mM，例如，從約 0.5 至 500mM。在某些具體例中，此緩衝成分以低濃度存在，例如從約 0.5 至約 250Mm，通常從約 0.5 至約 100Mm。在某些具體例中，此緩衝成分以較高濃度存在，例如，從約 50 至約 500mM。此試劑組成物可為乾燥的試劑配製物，例如，存在於將詳述於下的電化學測試條內，乾燥組成物內之緩衝成分的含量一般為從約 0.01 至約 40.00，通常為從約 1 至約 10%重量/重量。

選擇性成分

如上所示，此試劑成分可進一步包括一種或多種下列額外的成分：濕潤劑、清潔劑、輔酶、酵素輔因子、安定劑、粘度改善劑或其之組合。

五、發明說明 (13)

濕潤劑及清潔劑

在有些具體例中，其試劑組成物可加入濕潤劑或清潔劑以利於試劑組成物均勻塗佈於電化學測試條上。亦可使用一種或多種其他製劑之組合。所加入之製劑可改善試劑的溶解度，以及加強毛細填充測試條的蕊給性質。可使用本技藝中所習知的製劑，例如，聚合物、消泡劑以及表面活性劑。代表性之表面活性劑/清潔劑包括，但不侷限於：特來通 (Tritons)、Macols、Tetronics、Silwets、Zonyls 及 Pluronic。適合的製劑包括聚乙烯氧化物和聚異丙烯氧化物之嵌段共聚物 (block copolymers) 的 Pluronic 材料。Pluronic 材料的實例包括具有極佳濕潤性質的 Pluronic P103 以及具有極佳清潔性質的 Pluronic F87 Prill。Pluronic P103 以及 F87 Prill 亦均具有大於 80°C 的混濁點溫度，其優點為具有在乾燥過程中避免組成物相變化的性質。

輔 酶

需要時試劑組成物中亦可加入活化酵素成分的輔酶。可利用之輔酶實例為吡咯嗉啉醌 (PQQ)。其他適合的輔酶包括，但不侷限於：視

五、發明說明 (14)

用於試劑之酵素類型可為菸醯胺腺嘌呤雙核酸 (NAD)、黃素腺嘌呤雙核酸 (FAD)、細胞色素，及其類似物。

酵素輔因子

在某些具體例中，本組成物進一步含一種或多種酵素的輔酶。適合的酵素輔因子包括雙價金屬陽離子，例如， Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等。

安定劑

試劑組成物中亦可加入安定劑以增加酵素的穩定性以及避免蛋白質的變性。安定劑亦有助於介質之氧化還原狀態的穩定性，特別是已氧化之氧化還原介質。安定劑的實例包括，但不侷限於：碳水化合物(例如，蔗糖、海藻糖、甘露糖醇，以及乳糖)、胺基酸、蛋白質(例如，牛血清白蛋白和白蛋白)以及例如 EDTA 之有機化合物和其類似物。

粘度改善劑

試劑中亦可加入粘度改善劑以改善液體試劑的流動力學。粘度改善劑的實例包括聚(丙烯酸)、聚(乙烯醇)、葡聚糖、牛血清白蛋白及其類似物。

五、發明說明 (15)

其他特性

此試劑組成分可為乾燥或液体狀的型式。各種如上述成分可有不同的含量，並且下述所指出的含量僅做為說明之目的。

在本試劑組成物的液体配製物中，其酵素成分一般的濃度為從約 35 至約 450，通常為從約 130 至約 270uM。其介質一般的含量為從約 250 至約 1,000，通常為從約 500 至約 1,000uM。其穩定緩衝成分的含量介於如上所述的範圍內。其任何輔酶的濃度一般為從約 60 至約 670uM，通常為從約 200 至約 430uM。其任何酵素輔因子的濃度一般為從約 0.5 至約 5mM。

在乾燥配製物中，酵素成分的含量一般為從約 1.5 至約 15，通常為從約 5 至約 10%乾燥物重量/重量。其介質一般的含量為從約 60 至約 85，通常為從約 75 至約 85%乾燥物重量/重量。其穩定緩衝劑成分的含量介於如上所述的範圍內。其輔酶的含量一般為從約 0.01 至約 0.1，通常為從約 0.03 至約 0.06%乾燥物重量/重量。其任何酵素輔因子的含量一般為從約 0.02 至約 0.2%乾燥物重量/重量。

五、發明說明 (16)

適合的代表性特殊配製物：

在適合的代表性特殊配製物中，物包括以葡萄糖脫氫酶做為酵素和以 PQQ 做為輔酶的配製物。亦可利用 Ca^{2+} 做為其酵素輔因子。在這些配製物中，PQQ 和 GDH 及 Ca^{2+} 結合而形成活化酵素，或全酶(holo-enzyme)。已知酵素之完全活化時每個 GDH 雙體分子需要兩個 PQQ 分子。在某些具體例中，試劑組成物內的 PQQ 對 GDH 莫耳比例為介於約 2 至約 4 之間。在進一步的具體例中，PQQ 對 GDH 的莫耳比例為介於約 2.2 至約 2.5 之間。這些代表性配製物內 GDH-PQQ 全酶的活性一般為從約 10 至 1,000 仟單位/毫升，通常至少約 50 至 300 仟單位/毫升。可利用光電比色分析法於 30°C 下測定酵素的活性。一般而言，以 3 份酵素溶液混合於 100 份的基質溶液。接著，控制其 5 秒鐘的吸光度在 600 奈米。基質溶液含 112mM 葡萄糖、2mM 啡啉硫酸乙酯、60nM 2,6-二氯靛酚，以及 50mM 六氫吡啶、N,N' 雙-(2-甲磺酸)(PIPES) 於 pH6.8。例如以 CaCl_2 之型式的 Ca^{2+} 含量一般為從約 0 至 10mM。此特定配製物內的介質為亞鐵氰化鹽，其一般之存在量為從約 0.1 至 10M，通

五、發明說明 (17)

常為從約 0.3 至約 1.0M。當含濕潤劑/清潔劑成分時，其含量為從約 10 至約 1,000mM。適合之特定緩衝劑為檸檬酸和/或苯六甲酸，其含量如上所述。

電化學元件

如上述摘要，本發明亦提供含本試劑組成物的電化學元件。已習知各種不同類型的電化學元件構造，其包括述於美國專利文件：5,723,284、5,834,224、5,942,102、5,972,199、5,997,817、6,083,710、6,121,009、6,134,461；以及 6,193,873；將其列述於此以供參考；以及其他專利文件：WO 99/49307、WO 97/18465、WO 01/57510、WO 01/57238、WO 02/48707、WO 02/50609、EP 0 969 097A2 及 GB 2 304 628；此處將美國專利申請之優先權證明書列述於此以供參考。本組成物涵蓋經熟習本技藝之人仕所改良的任何上述或其他電化學元件。

在某些具體例中，其電化學元件可利用電化學測試條的形式呈現。一種根據本發明的代表性電化學測試條說明於圖 1 和圖 2。圖 1 為電化學測試條 10 的分解圖，其由工作電極 12 以及被具有切開部分 18 以做為組合測試條之反應

五、發明說明 (18)

帶或區域的隔層 16 所隔開的參考電極 14。圖 2 為組合上述相同測試條後所呈現的外觀。將於下述更詳細說明其各種不同的構件。

電 極

含試劑組成物的本電化學測試條包括工作電極和參考電極的構造。一般而言，該工作和參考電極呈延長矩形測試條的形狀。其特色為，電極的長度為從約 1.9 至約 4.5 公分，通常為從約 2 至約 2.8 公分。電極的寬度為從約 0.38 至約 0.76 公分，通常為從約 0.51 至約 0.67 公分。參考電極一般的厚度為從約 10 至 100 奈米，其通常為從約 18 至約 22 奈米。在特定具體例中，其中一電極的長度較另一電極的長度為短，在某些具體例中，其長短差異約為 0.32 公分。

此工作及參考電極進一步的特色在於至少其面向測試條內反應區域的電極表面為例如金屬或其他導電材料之導電材料所製成，其適合的代表性材料包括，但不侷限於：鈦、金、鉑、銀、銻、碳、摻雜錫之氧化物、不銹鋼，及其類似物。在某些具體例中，其導電材料為金或鈦。雖然原則上全部電極可用導電材料製

五、發明說明 (19)

成，但電極的表面通常以惰性支撐材料製成而使導電材料成分於電極上形成一薄層。本電極可應用任何適合的惰性墊背材料，其一般為能夠提供電極足夠支撐的材料，或者可提供整個電化學測試條足夠支撐的材料。可使用做為墊背基質的適合材料包括例如 PET、PETG 的塑膠；聚醯亞胺；聚碳酸酯；聚苯乙烯；聚矽氧；陶瓷；玻璃，及其類似物。

隔層

本電化學測試條的特色為其工作和參考電極如上所述僅以相隔極短的距離相對而置，因此電化學測試條之反應帶或區域的工作電極和參考電極之間僅留下極小的距離。本測試條之工作和參考電極之間所留下的極小空隙使工作電極和參考電極之間可置入或夾著一層極薄的隔層。此隔層的厚度一般為從約 1 至約 500 微米，通常為從約 100 至約 200 微米。此隔層經切開故可提供至少具有一個進入反應區域之入口孔的反應帶或區域，並且該反應區域一般亦具有一個出口孔。圖 1 和 2 為代表性隔層的構造。雖然隔層所顯示的構造為側面具有入口和出口孔或門的圓形反應區域，但是，亦可具有

五、發明說明 (20)

其他形狀的構造，例如，正方形、橢圓形、三角形、長方形、不規則形狀等的反應區域。可利用任何適合的材料製成該隔層，其代表性適合的材料包括 PET、PETG、聚醯亞胺、聚碳酸酯及其類似物，隔層的表面可經過處理而使其可被黏著於各自的電極，而因此維持其電化學測試條的結構。最適合為使用沖切雙面粘性測試條做為其隔層。

反應帶

本電化學測試條包括被工作電極、參考電極及隔層等如上述構件所界定的反應帶或區域。明確而言，工作和參考電極界定反應區域的上和下部分，而隔層則界定反應區域的側壁。反應區域的容積至少約 0.1 微升，通常至少約 1 微升及最常為至少約 1.5 微升，但其容積可大至 10 微升或以上。如上所述，此反應區域通常至少具有一個入口孔，以及在許多具體例中亦可具有一個出口孔。入口孔和出口孔具有可提供液體進出反應區域之足夠大小的截面積，但其一般為從約 9×10^{-5} 至約 5×10^{-3} 平方公分，通常則為從約 5×10^{-4} 至約 2.5×10^{-3} 平方公分。

反應區域內為本發明之試劑配製物，該試

五、發明說明 (21)

劑配製物一般呈乾燥的型式。

分析物的偵測方法

本發明亦提供利用試劑組成物測定生理樣本內分析物濃度的方法。為方便之計，根據上述代表性測試條說明本方法。然而，本發明並非僅侷限於該說明的方法，電化學元件內利用本試劑配製物偵測分析物的任何方法均涵蓋於本發明的範圍內。

本方法包括以含本發明試劑組成物之電化學測試條施加於樣本、偵測測試條所產生的電信號以及將所偵測的電信號轉換成樣本內分析物的濃度。可利用本測試條偵測各種不同的分析物，其代表或分析物包括葡萄糖、膽固醇、乳酸鹽、酒精，及其類似物。在許多較佳具體例中，本方法被應用於生理樣本內葡萄糖濃度的測定。雖然本方法主要用於偵測各種不同生理樣本內分析物的濃度，例如尿液、眼淚、唾液及其類似物，但其特別適合用於偵測血液或血液成分以及更特別為全血內分析物的濃度。

本方法開始進行時，其第一步驟為引入一定量的生理樣本至如上所述測試條的反應區域。引入測試條之反應區域內的例如血液生理

五、發明說明 (22)

樣本可有不同的數量，但一般為從約 0.05 至約 10 微升，通常為從約 0.5 至約 1.6 微升。可利用任何可行的方法將樣本引入反應區域，適當時，樣本可被注入反應區域或利用蕊給效果引入反應區域。

在施予樣本於反應區域之後，利用參考和工作電極開始以電化學方法進行偵測。視所使用電化學測試條之檢測及裝置的特定性質可有各種不同的電化學偵測方法，例如，檢測方法可視其是否為電量法、電流法或電位法而定。一般而言，電化學測量法通常為樣本引入反應區域一段時間之後開始測定其電荷(電量法)、電流(電流法)或電位(電位法)的變化。如上所述之電化學測量方法進一步說明於美國專利號碼：4,224,125；4,545,382；和 5,266,179；以及 WO 97/18465；WO 99/49307；將其揭示於此以供參考。

在偵測出如上述反應區域內所產生的電化學信號之後，引入反應區域內之樣本的分析物數量可藉所測得的電化學值換算成樣本內分析物的數量。在演算過程中，一般為利用所測得的電化學信號和一系列先前所測得的控制或標

五、發明說明 (23)

準信號值進行比較。在許多具體例中，其樣本之分析物濃度偵測裝置的上述電化學信號測量步驟及分析物濃度演算步驟可被自動化，因此使用者僅需將樣本置入反應區域內即可直接讀取裝置上所顯示之分析物濃度的最後結果，其進一步說明於美國專利號碼 6,193,873；將其揭示於此以供參考。

此方法可被應用於各種不同分析物之濃度的測定，其代表性分析物包括葡萄糖、膽固醇、乳酸鹽、酒精，及其類似物。在許多較佳的具體例中，本方法被應用於生理樣本中葡萄糖濃度的測定。雖然本方法主要被應用於例如尿液、眼淚、唾液及其類似物之各種不同生理樣本內之分析物濃度的測定，但是，其特別適合用於血液或血液成分中分析物的濃度測定，例如，血液衍生樣本，以及更特別為全血。

偵測系統

本發明亦提供含根據本發明之試劑組成物的分析物偵測系統，例如，如上所述的測試條，以及利用本試劑以電化學方法檢測樣本的裝置。

本系統之裝置或檢測計一般為電化學測量

五、發明說明 (24)

裝置。檢測計一般包括：(a) 施予電位至已引入樣本之電化學元件的設備；(b) 測量元件內電流的設備；以及(c) 將相關電流換算成元件內之分析物濃度的設備。代表性電化學檢測計或裝置說明於美國專利文件：5,723,284；5,834,224；5,942,102；5,972,199；5,997,817；6,038,710；6,121,009；6,134,461；和 6,193,873；將其揭示於此以供參考；以及其他專利文件：WO 99/49307；WO 97/18465；WO 01/57510；WO 01/57238；WO 02/48707；WO 02/50609；EP 0 969 097A2 和 GB 2 304 628。

測試套組

本發明亦提供用於執行本方法的套組。本發明之套組含如上所述之試劑組成物，該組成物通常被置於如上所述的測試條上。本套組可進一步包括取得生理樣本的獲取元件，例如札指尖的採血針、活動柳葉刀裝置，及其類似物。此外，本套組可含一種標準分析物，例如，含標準化濃度之葡萄糖的控制溶液。在某些具體例中，用於試劑組成物和測試條的套組亦可包括一種如上所述的自動化設備。

最後，此套組可包括使用本組成物以測定

五、發明說明 (25)

生理樣本內分析物濃度的說明書。此說明可印製於例如紙或塑膠板上。此時，該說明書可置入套組的包裝盒內，或印製於套組或其成分的容器標籤上(即，配合其包裝或次包裝)。在其他具體例中，該說明書為以電子資料檔案儲存於適當的電腦可讀取儲存媒體內，例如，唯讀光碟機(CD-ROM)、磁碟等。

下列實施例僅做為說明之用途，並且本發明並非僅侷限於此範圍。

實 驗

實施例 1. 使用檸檬酸、蘋果酸和酒石酸鹽的葡萄糖線性度結果。

於 pH5.5 之下分別配製 100mM 濃度的檸檬酸、蘋果酸和酒石酸鹽緩衝溶液。全部三種配製物亦含等量的 0.1% 消泡劑(RNA 平衡劑)、1mM CaCl₂、PPQ(2x 對 GDH 的 M 比)、200mM 的亞鐵氰化鉀，以及 45 毫克/毫升的 GDH。將各種配製物噴塗於鈀基片上。以含葡萄糖的血液利用施予 10 秒鐘 -0.3 伏特電壓然後施予 5 秒鐘 +0.3 伏特電壓的電化學方法測試此感測器。血液的測試顯示葡萄糖在全部的測試中有極佳

五、發明說明 (26)

的線性度(圖 3)。檸檬酸和蘋果酸緩衝劑的背景極為類似，而酒石酸緩衝劑的背景則較高。此外，由於酒石酸可和 Ca^{2+} 形成不可溶鹽類，故較不適合使用。

實施例 2. 使用檸檬酸和苯六甲酸鹽的葡萄糖線性度和血容比的結果

於 pH5.5 之下配製 400mM 的檸檬酸鹽緩衝溶液。於 pH6.4 之下配製 160mM 的蘋果酸鹽緩衝溶液。兩種配製物內均含等量的 0.1% 消泡劑 (RNA 平衡劑)、1mM CaCl_2 、PPQ(2x 對 GDH 的 M 比)、200mM 的亞鐵氰化鉀，以及 32 毫克/毫升的 GDH。利用三種不同的血容比濃度(20、42 和 70%)以及四種不同的葡萄糖濃度進行血液的測定(圖 4 和 5)。其葡萄糖的反應非為線性，但隨著葡萄糖濃度的增加而增加。檸檬酸鹽緩衝液的血容比性能較蘋果酸鹽稍佳。其結果列於表 4 和 5。

實施例 3. 利用檸檬酸和檸檬酸鹽的血容比和穩定性結果

於 pH6.5 之下分別配製 300mM 濃度的檸檬酸和檸檬酸鹽緩衝溶液。兩種配製物亦含等量

五、發明說明 (27)

的 0.1% 消泡劑 (RNA 平衡劑)、4mM CaCl_2 、PPQ(2x 對 GDH 的 M 比)、800mM 的亞鐵氰化鉀，以及 46 毫克/毫升的 GDH。以噴墨的方法將配製物沉積於鈦基片上。檸檬酸和檸檬酸鹽緩衝液的血容比性能相類似(圖 6 和 7)。於 56°C 之下加熱 14 天之後顯示檸檬酸鹽的背景和性能穩定性較檸檬酸鹽為佳(表 1)。表 1 中所示的偏差為在 40 毫克/分升葡萄糖濃度的絕對反應差異，以及為葡萄糖濃度大於 100 毫克/分升的百分比偏差。

表 1

葡萄糖濃度	檸檬酸鹽		檸檬酸鹽	
	第 0 天和 YSI 的偏差	第 14 天於 56°C 和 YSI 的偏差	第 0 天和 YSI 的偏差	第 14 天於 56°C 和 YSI 的偏差
40	6.98	5.38	4.57	-7.06
240	6.52	3.69	1.44	-25.77
540	0	1.45	0	-35.35

實施例 4. 利用檸檬酸和蘋果酸鹽的線性度和穩定性結果

於 pH6.5 之下分別配製 300mM 濃度的檸檬酸鹽和蘋果酸鹽緩衝溶液。兩種配製物亦含等量的 0.066% 的 Pluronic 25R2、0.033% 的 Pluronic L62、4mM CaCl_2 、PPQ(2x 對 GDH 的 M

五、發明說明 (28)

比)、800mM 的亞鐵氰化鉀，以及 26 毫克/毫升的 GDH。以噴墨的方法將配製物沉積於鈦基片上。以額定血容比的初步性能測試顯示有極佳的線性度(圖 8)。其穩定性資料顯示兩者均具有穩定的背景；然而，蘋果酸緩衝劑配製物的性能在高葡萄糖濃度下有劣化的現象—表示具有酵素不穩定性(表 2)。

表 2

葡萄糖濃度	檸檬酸鹽		蘋果酸鹽	
	第 0 天和 YSI 的偏差	第 14 天於 56°C 和 YSI 的偏差	第 0 天和 YSI 的偏差	第 14 天於 56°C 和 YSI 的偏差
40	6.17	4.52	0.03	-0.93
240	7.29	3.93	-0.26	-10.93
540	-3.41	-0.08	-12.20	-25.37

實施例 5. 利用檸檬酸和蘋果酸鹽的血容比和穩定性結果

除藉吸管沉積及在加熱板上以熱氣流乾燥其試劑之外，其餘均以類似實施例 4 的方法製備測試條。圖 9 和 10 顯示以檸檬酸和蘋果酸鹽緩衝液製成之葡萄糖感測器的穩定性資料。其選定的 pH 為 6.5，以及蘋果酸和檸檬酸的緩衝液濃度分別為 105 和 40mM。感測器儲存於 5°C 或 56°C 下 2 週之後以 18、37 和 63% 血容比之血

五、發明說明 (29)

液進行測定。

上述的結果和討論顯示本發明所提供的電化學試劑組成物具有可穩定儲存之介質。本發明的優點包括可獲得更準確的結果，以及可避免使用較不穩定的試劑和/或得到錯誤的判讀。因此，本發明為本技術領域上的一項突破。

將有關此專利申請的全部公告和專利引述於此以供參考，並且其獨立之公告和專利均被視為特定和獨立的參考個案。所引述的任何公告均為其專利申請日之前的揭示，因此，不可推論本發明已承認其為抄襲自先前發明的較晚發明。

本發明為清楚瞭解之目的雖然已藉由圖表及實施例進行詳細說明，故即使熟習本技藝之人仕仍能將本發明做其他各種不同形式的變化和修改，其仍然未偏離本發明附件之專利申請範圍內所涵蓋的精神和範圍。

五、發明說明 (30)

元 件 編 號 說 明

10	電化學測試條
12	工作電極
14	參考電極
16	隔層
18	切開部分

裝
訂
線

四、中文發明摘要（發明之名稱：經介質穩定之試劑組成物及其用於電化學分析物偵測之方法）

提供經介質穩定之試劑組成物及其用於電化學分析物偵測之方法。本試劑組成物包括酵素、氧化還原介質和介質穩定緩衝劑。或者，試劑組成物可進一步包括一種或多種濕潤劑、清潔劑、酵素輔因子和其之組合。亦提供含試劑組成物的電化學測試條，包含該等組成物之系統和套組，以及用於分析物偵測檢查之方法。本發明可有各種不同的應用，其包括應用於葡萄糖濃度的檢測。

英文發明摘要（發明之名稱：Mediator stabilized reagent compositions and methods for their use in electrochemical analyte detection ASSAYS）

Mediator stabilized reagent compositions and methods for their use in electrochemical analyte determination assays are provided. The subject reagent compositions include an enzyme, a redox mediator and a mediator-stabilizing buffer. Optionally, the reagent compositions may further include one or more of a wetting agent, detergent, enzyme cofactor and combinations thereof. Also provided are electrochemical test strips that include the subject reagent compositions, systems and kits that include the same as well as methods for using the same in analyte detection assays. The subject invention finds use in a variety of different applications, including glucose concentration determination applications.

六、申請專利範圍

1. 一種試劑組成物，其包括：

- (a) 一種酵素；
- (b) 一種氧化還原介質；以及
- (c) 一種可穩定該儲存氧化還原介質之足夠含量的介質穩定緩衝劑。

2. 如申請專利範圍第 1 項之試劑組成物，其中該緩衝劑含一種聚羧酸。

3. 如申請專利範圍第 2 項之試劑組成物，其中該聚羧酸為苯六甲酸及其鹽類。

4. 如申請專利範圍第 2 項之試劑組成物，其中該聚羧酸為檸檬酸及其鹽類。

5. 一種含如申請專利範圍第 1 至 4 項試劑組成物的電化學元件。

6. 一種含如申請專利範圍第 5 項之電化學元件的電化學測試條。

7. 一種製造電化學測試條的方法，其改良包括：

應用如申請專利範圍第 1 至 4 項的試劑組成物。

8. 一種測定樣本內分析物的方法，該方法包括：

- (a) 將該樣本置入如申請專利範圍第 5

六、申請專利範圍

項的電化學元件；

- (b) 偵測該元件所產生的電信號；以及
- (c) 將該偵測之電信號換算成樣本內該分析物的濃度。

9. 一種用於測定生理樣本內分析物濃度的套組，該套組包括：

- (a) 一種如申請專利範圍第 6 項的電化學測試條；以及
- (b) 至少包括一種：
 - (i) 樣本獲取元件；以及
 - (ii) 分析物標準物。

10. 一種系統，其包括：

- (a) 一種如申請專利範圍第 6 項的電化學測試條；以及
- (b) 讀取該測試條的測量錶。

圖 1

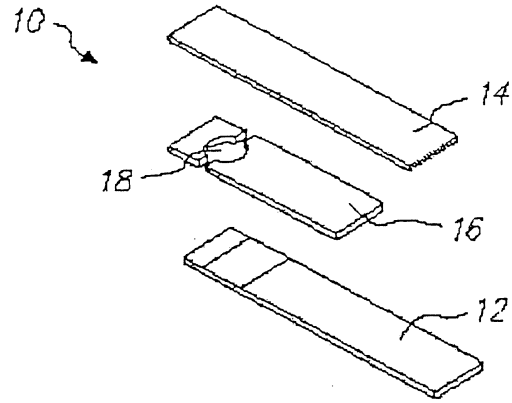


圖 2

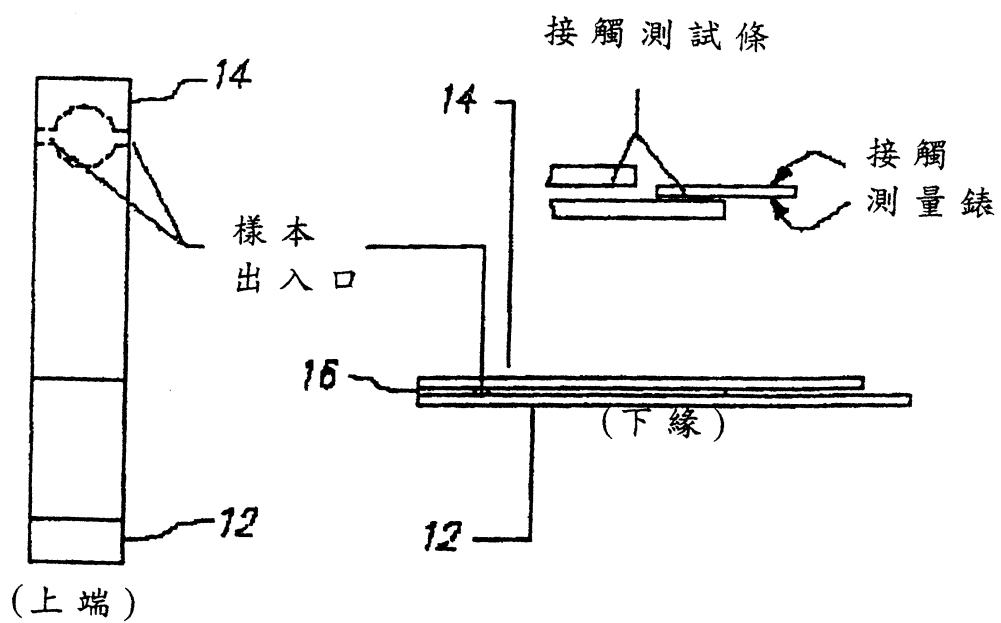


圖 3

含檸檬酸鹽、蘋果酸和酒石酸配製物的線性測試比較結果

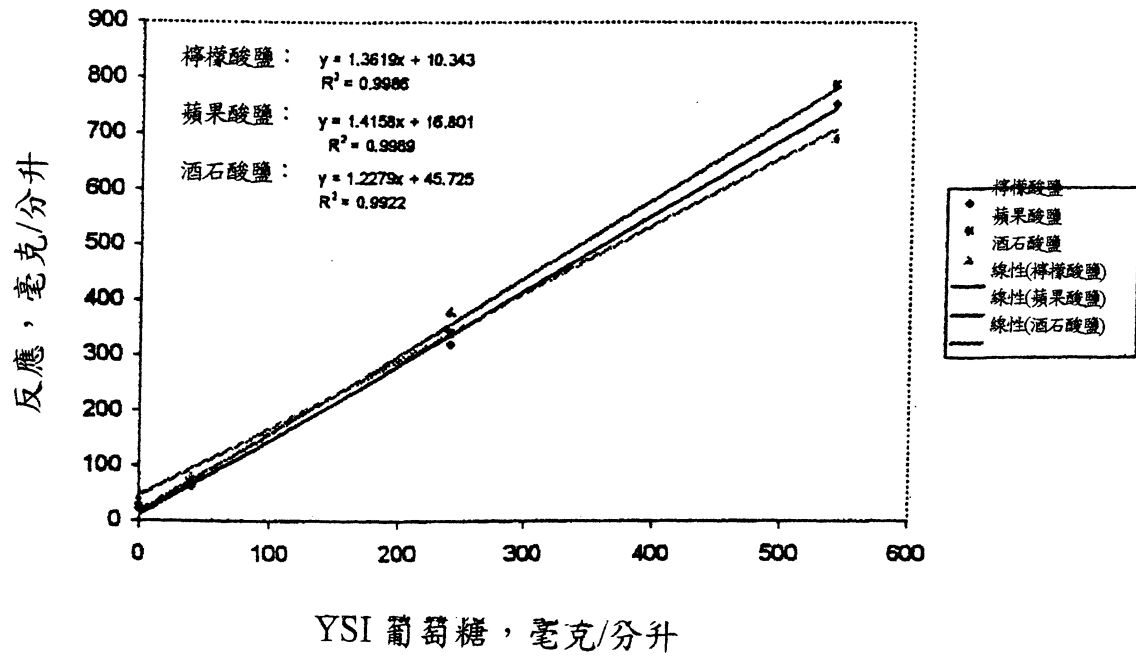


圖 4

噴墨檸檬酸鹽配製物的血容比效果

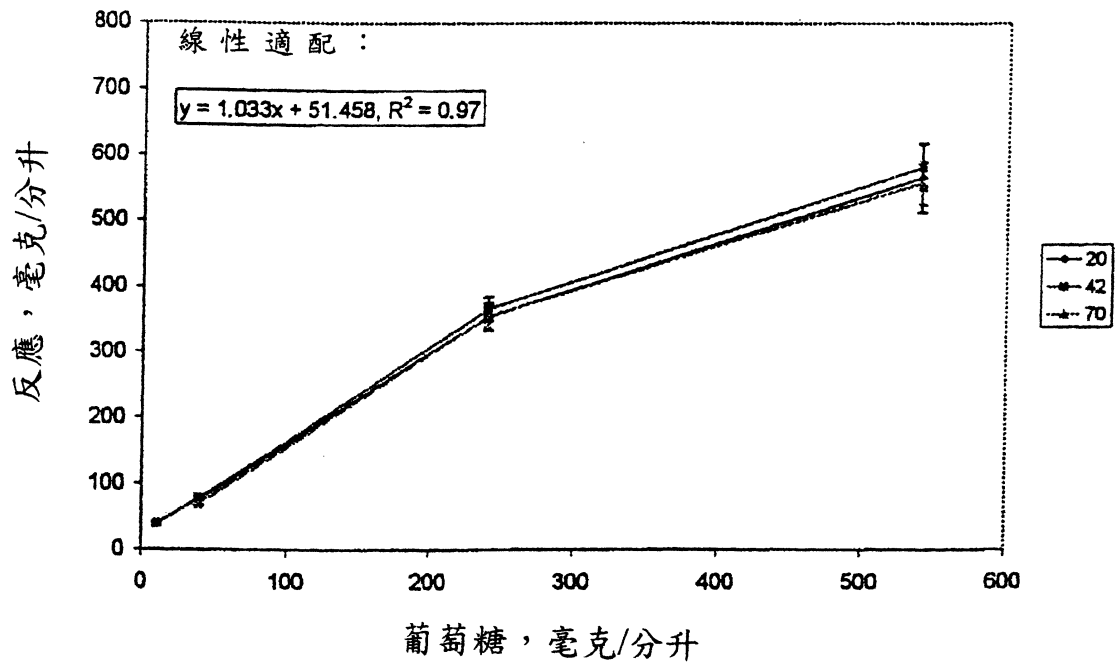


圖 5

噴墨蘋果酸配製物的血容比效果

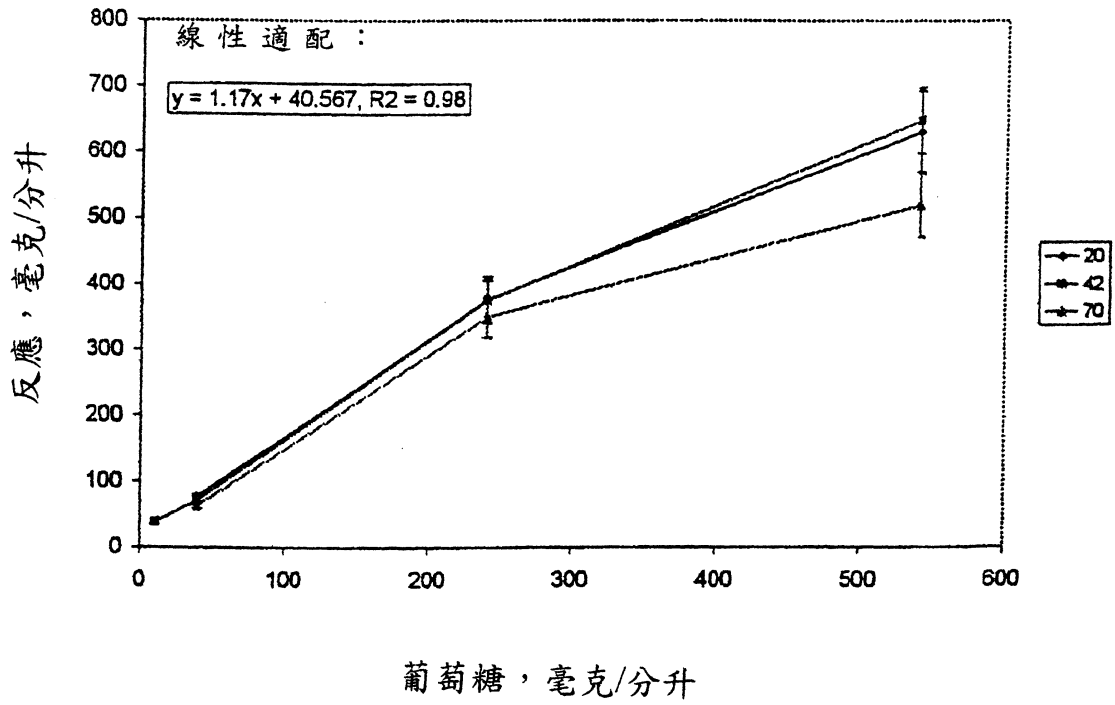


圖 6

檸檬酸配製物的血容比性能

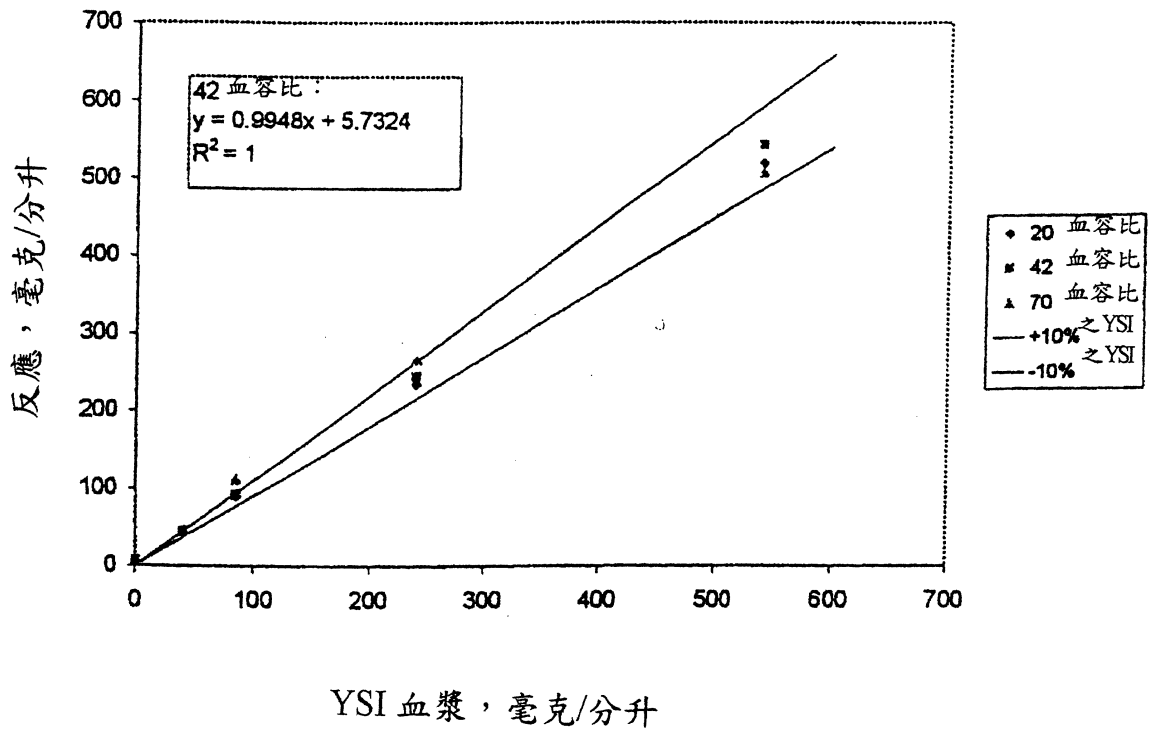


圖 7

檸檬酸配製物的血容比性能

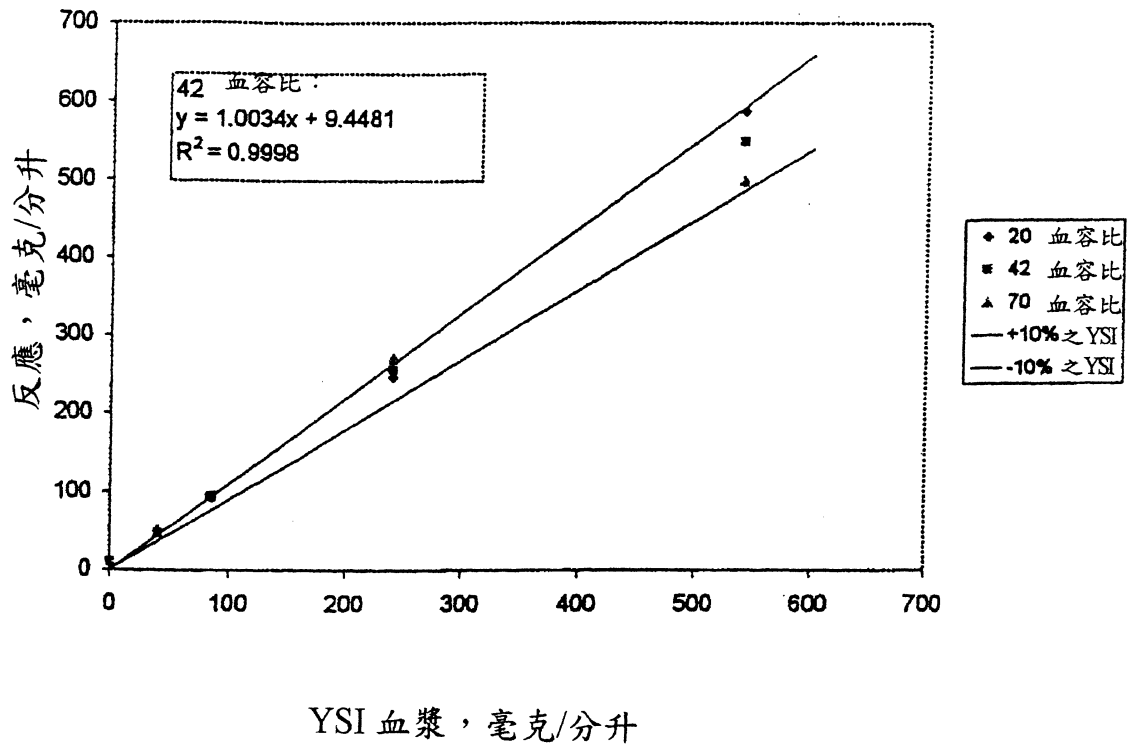
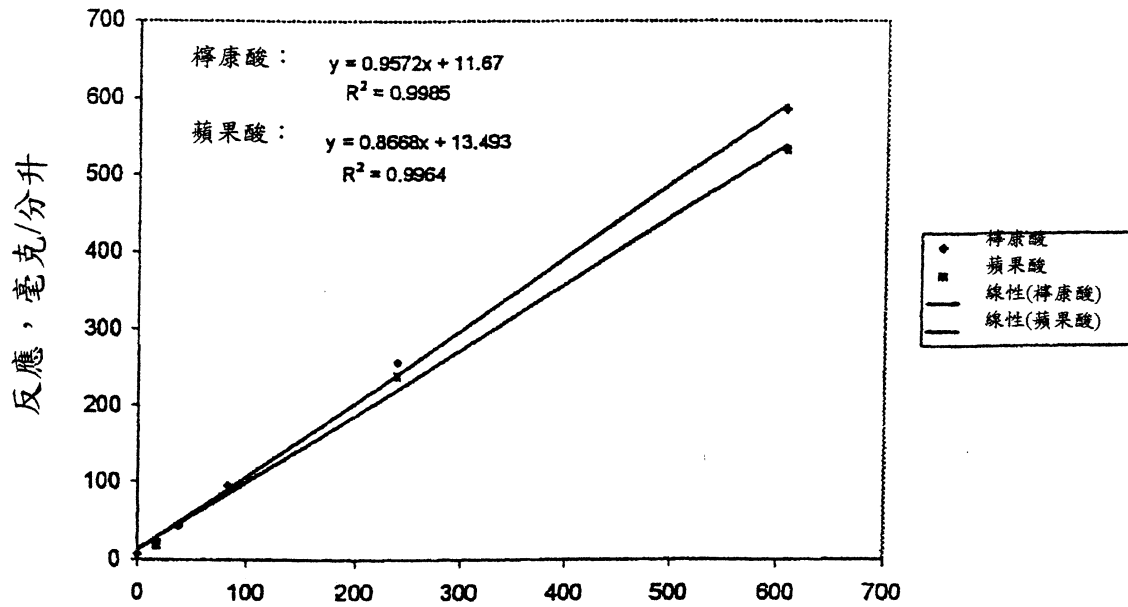


圖 8

檸檬酸和蘋果酸配製物的線性試驗



YSI 血漿, 毫克/分升

圖 9

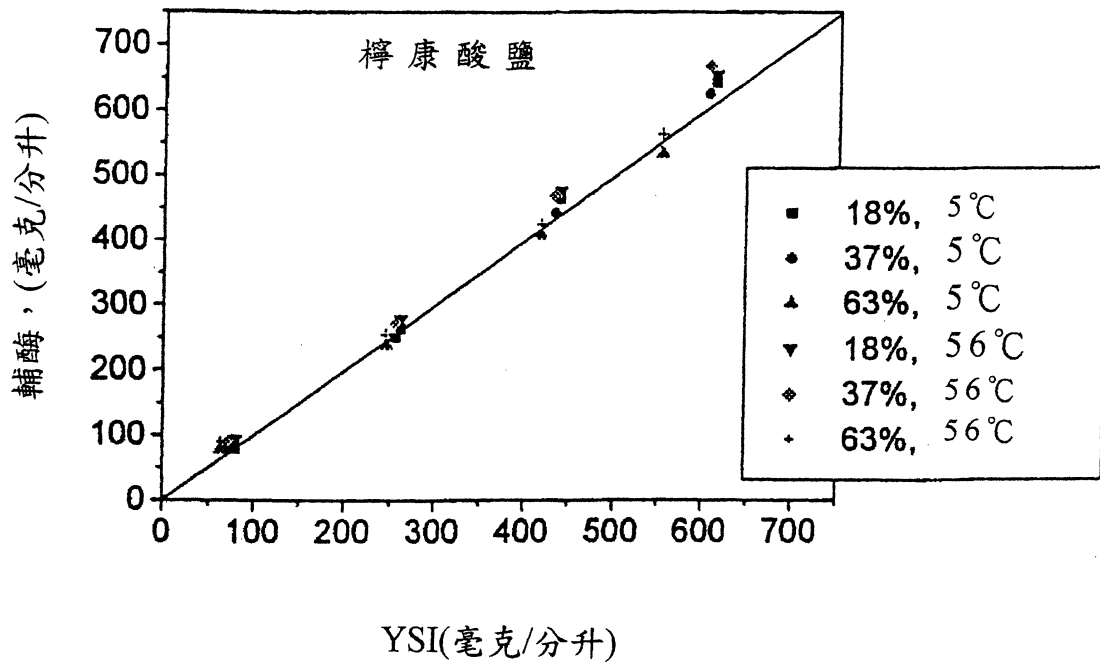
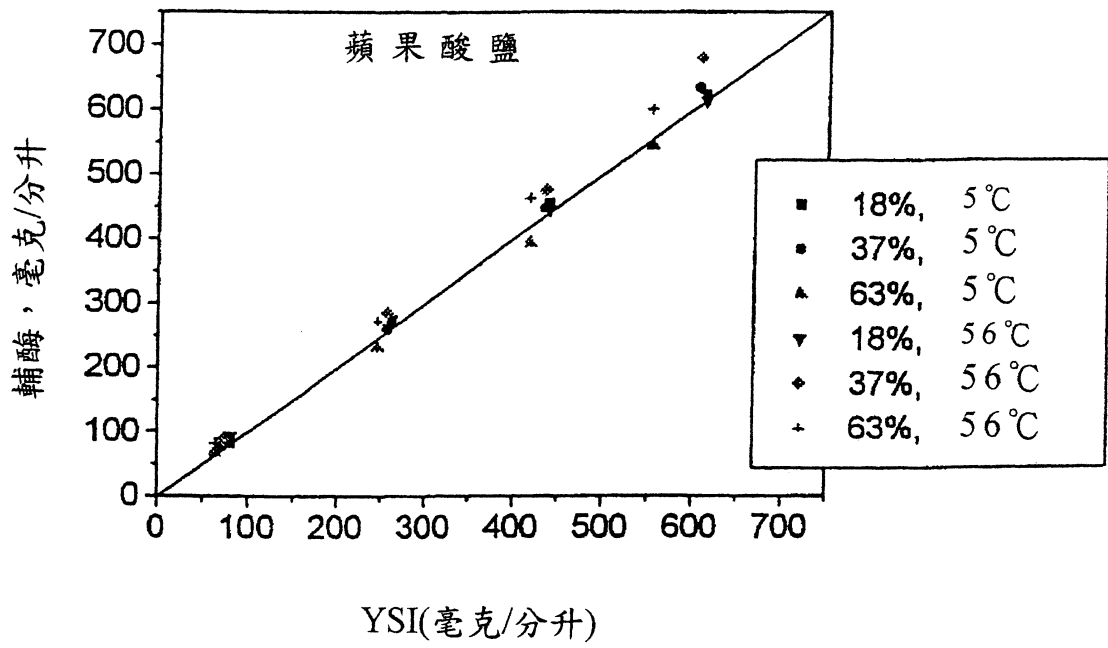


圖 10



(一)、本案指定代表圖為：第 1 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

10	電化學測試條
12	工作電極
14	參考電極
16	隔層
18	切開部分

本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的
化學式：

無