



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90109693.8

[51] Int.Cl<sup>5</sup>

G01N 33 / 50

[43] 公开日 1991年6月19日

[22] 申请日 90.12.1

[30] 优先权

[32]89.12.2 [33]DE [31]3940010.7

[71] 申请人 曼海姆泊灵格股份公司

地址 联邦德国曼海姆

[72] 发明人 约阿希姆·赫内斯 汉斯·韦林格  
福尔克·昂克里格

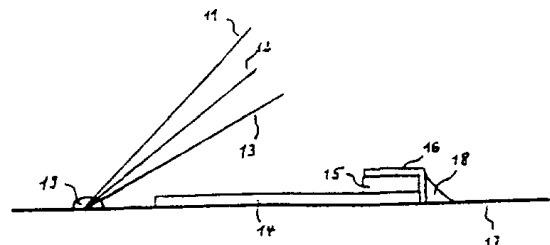
[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司  
代理人 孟八一 魏金玺

说明书页数: 21 附图页数: 4

[54] 发明名称 微溶性杂多酸盐在测定被分析物中的应用及相应测定方法与相关试剂

[57] 摘要

本发明涉及微溶性杂多酸盐在测定被分析物中的应用,特别可用于被分析物是富电子芳香胺,或者被分析物与能与另一其他物质反应产生富电子芳香胺的情况。本发明还涉及借助生成杂多蓝来测定被分析物的方法。此方法的特征在于先将被分析物与一物质反应产生一种富电子芳香胺,再使胺与微溶性杂多酸盐以及相应试剂接触。



< 35 >

## 权 利 要 求 书

---

1. 微溶性杂多酸盐在测定被分析物中的应用。

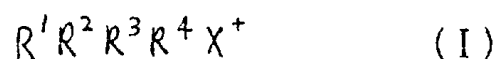
2. 按照权利要求1所述的微溶性杂多酸盐的应用, 其中被分析物是一种富电子芳香胺或者是一种经过与一种或几种其他物质或酶初步作用即可产生富电子芳香胺的物质。

3. 借助生成杂多酸盐来测定被分析物的方法, 其中被分析物先与一种物质反应产生富电子芳香胺, 然后再使此胺与微溶性杂多酸盐接触。

4. 按照权利要求3的方法, 其中使用的微溶性杂多酸盐中的杂多酸为含磷、砷、硅或锗杂原子的钼、钼和钨、钒和钼, 或钒和钼和钨的杂多酸。

5. 按照权利要求3和4中任一权项所述的方法, 其中的微溶性杂多酸盐是一种其阳离子大于铵离子的盐。

6. 按照权利要求3到5中任一权项的方法, 其中所使用的微溶性杂多酸盐, 其阳离子具有通式 I



式中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>可以相同, 也可以不同, 它们代表烷基、芳基或芳烷基或氢, 如果并不是所有的基团都相同的话, 或式中两个基团一起形成亚烷基,

X 代表一个磷或氮原子。

7. 按照权利要求3到5中任一权项所述的方法, 其中作为微溶性杂多酸盐采用带有四价氮杂芳香阳离子的盐。

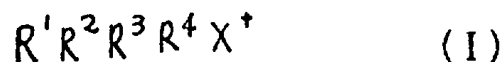
8. 借助生成杂多蓝来测定富电子芳香胺的方法，其中待测富电子芳香胺的溶液要与微溶性杂多酸盐接触。

9. 借助生成杂多蓝来测定被分析物的试剂，其中该试剂含有与被分析物作用能产生富电子芳香胺的物质，它还含有微溶性杂多酸盐或该测定所必须的物质。

10. 按照权利要求9所述的试剂，其中该试剂含有由带有磷、砷、硅或锗原子的钼、钼和钨、钒和钼或钒和钼和钨的杂多酸微溶性盐。

11. 按照权利要求9和10所述的试剂，其中作为微溶性杂多酸盐的盐，其阳离子大于铵离子。

12. 按照权利要求9到11任一权项所述试剂，其中它含有其阳离子为通式 I 的微溶性杂多酸盐



式中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 可以相同，也可以不同，并且代表烷基、芳基或烷芳基或氢，如果不是所有基团都相同的话，或者其中两个基团一起形成的亚烷基，

X 代表磷或氮原子。

13. 按照权利要求9到11中任一权项所述的试剂，其中它含有的盐是杂多酸微溶性盐，该盐的阳离子来自四价氮杂芳香物的盐。

14. 借助生成杂多蓝来测定富电子芳香胺的试剂，其中它含有杂多酸微溶性盐或其它所需物质，这些物质可置于液态介质中或置于载合物中。

15. 微溶性杂多酸盐在制备一种试剂中的应用，这种试剂能借助生成杂多蓝来测定被分析物。

微溶性杂多酸盐在测定被分析物中的应用及相应测定方法与相关试剂

本发明涉及微溶性杂多酸盐在测定一种被分析物中的应用，同时还涉及借助生成杂多蓝来测定被分析物的方法和相应的试剂。最后本发明还涉及微溶性杂多酸盐在制备一种试剂中的应用，该试剂借助生成杂多蓝来测定被分析物。

杂多酸是无机多元酸，它们至少有两不同的中心原子。杂多酸是金属如钼、钨、钒之类与非金属如磷、砷、硅、碘或与金属如铁、镁、钴组成的多价含氧酸混酐。例如磷钼酸和磷钨酸。杂多酸溶于水，但是它们只能稳定存在于酸性溶液中。

钼和钨的杂多酸是人们早知道的试剂。钼盐和钨盐能与磷酸盐、砷酸盐或硅酸盐形成相应的杂多酸，这些杂多酸可被还原成一种蓝色染料即所谓杂多蓝，所以钼和钨的杂多酸通常被用来测定磷酸盐、砷酸盐或硅酸盐。这种蓝色是由于钼或钨的五价态与六价态之间发生电子转移时吸收光后产生的。由杂多酸形成的杂多蓝在任何情况下都是一种强吸收染料，它们的最大吸收波长范围很宽。这是典型的电子转移吸收谱带。

人们知道，杂多酸能形成杂多蓝而被用于测定还原性化合物。在 F. Feigl 所著，“有机分析中的点滴”一书，Elsevier 出版公司，1956，中 128-129 页中有这样的描述：许多还原性的物质可将 12-钼二磷酸还原成钼蓝。由于显色检验反应不专一，为了达到一定的选择，建议先

将被测样品碱化再用乙醚萃取。这样乙醚萃取物中主要成分为含氮芳香碱和醚溶性物质，酸性物质则留在水相中。

据文献P. B. Issopoulos, Pharm. Acta. Helv 64 82 (1989)报道，一些具有邻苯二酸结构的药物如甲基多巴，在硫酸溶液能将钼二磷酸还原形成钼蓝。

文献M. L. Matheke et al. Clin. Chem. 33 2109-2110 (1987)报道了磷钨酸在测定尿酸中的应用。还原性钨蓝的形成可作为检测尿酸存在的指示剂。还原性药物会干扰此检验反应。

在B. Klen et al, Clin. Chem. 12, 816-823 (1966)中报道了一种测定血清或血浆中葡萄糖的方法，此方法依据下列反应结果：

葡萄糖被六氰高铁(Ⅲ)酸钾氧化，由此形成的六氰高铁(Ⅱ)酸钾再将磷钼酸还原，形成钼蓝。由于血液和体液中会含有不等量的尿酸、药物或者其他还原性物质如胆红素或谷酰甘肽，所以它们肯定会干扰上述方法。

以上这些依据从杂多酸生成还原性杂多蓝的分析方法的最主要的缺点是：它们各自的检验反应都是非专一性反应的。很多还原性物质由；于它们也能导致形成杂多蓝而干扰分析。另外，杂多酸只在酸性条件下稳定，这就大大限制了杂多酸的应用范围。特别指出，为了特征地检验和测定一些物质而形成杂多蓝与酶催化反应结合的方法到目前为止还鲜为人知。然而酶催化反应测定方法通常是必需的，尤其是在测定体液如血液、血清、血浆和尿等中的成分时。

本发明的目的是将杂多蓝的形成用作某些物质的检验反应和测定反应，特别用于那些体液中的尤其是与酶催化反应步骤有关的物质。

还原性伴随物不会干扰这一方法，并且该检验和测定方法应该在酶催化反应所要求的PH值下进行。另外，它使快速检验和测定成为可能。

按照权利要求书中所限定的方法可以达到这一目的。

我们发现，微溶性杂多酸盐很适合用于测定一种被分析物，当被分析物为富电子芳香胺或者此被分析物能与另一物质结合生成富电子芳香胺时尤其如此。

借助形成杂多蓝来测定被分析物的本发明方法的特征在于：这种被分析物先与一种物质反应产生一个富电子芳香胺，再将此胺与微溶性杂多酸盐作用。当然本发明方法本身也可用于测定富电子芳香胺，具体方法是使胺的溶液与微溶性杂多酸盐作用即可。

本发明的从属目的是将微溶性杂多酸盐用于制备一种通过形成杂多蓝来测定被分析物试剂。

根据本发明可提供一种借助形成杂多蓝来测定被分析物的试剂。该试剂的特征在于它包括一种能与被分析物作用生成一种富电子芳香胺的物质，还包括一种微溶性杂多酸或者那些经反应产生微溶性杂多酸盐的物质。如果本发明所述的这种试剂是直接用于测定富电子芳香胺的话，那么它只包括微溶性杂多酸盐或者是那些液体介质中或其结合载体中能产生上述盐的物质也就足够了。

根据本发明，微溶性杂多酸盐可用于测定被分析物。就本发明而言，微溶性杂多酸盐可以理解为：杂多酸盐是一种在水或水性介中如缓冲液或体液例如血液、血清、血浆、尿和唾液中，完全不溶或极少量溶解的盐并且在检验和显色条件下上述理解保持原意。这种杂多酸盐是如此的难溶以至于可溶解于液体样品中的最大量也不足以使其本

身能测得液体样品中的被分析物。

令人惊奇的是，上述微溶性杂多酸盐不仅在酸性PH值范围稳定，而且在中性和碱PH范围内甚至PH可接近10也稳定。这样它可以在大多数酶呈活性的PH范围内使用。所以这种微溶性杂多酸盐能用于与酶催化反应有联系的杂多蓝的生成。微溶性杂多酸盐在高温下也稳定，特别是在非溶解状态下。结果显示，尽管溶度很小，使用本发明所述的杂多酸盐能在几秒到几分钟内借助生成杂多蓝对被分析物进行检验和测定。用此方法使在不受其他还原性物质干扰下进行选择性测定成为可能。这就产生了一种对测试仪器没有特殊要求的灵敏测定方法，并且由于杂多蓝的最大吸收波长范围较宽，550-1100mm 以上，容易进行目测。

本发明所使用的杂多酸盐是带有杂原子磷、砷、硅或锗的钼、钼和钨、钒和钼或钒和钼和钨杂多酸蓝。含磷或砷的钼杂多酸是特别适用的。磷是首选的非金属原子，钼是首选的金属原子。最后适合的微溶性杂多酸蓝的酸是12-钼磷酸、18-钼二磷酸、12-钼砷酸、18-钼砷酸、11-钼-1-钒磷酸、10-钼-2-钒磷酸和9-钼-3-钒磷酸，其中18-钼二磷酸最受推崇，因它在被还原为钼蓝时颜色最深。

微溶性杂多酸蓝所含的阳离子比氨离子NH要大。其阳离子的化学通式 I 表示，



其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>代表相同或不同的烷基、芳基或烷芳基或氢，如果不是所有基团都相同的话，或其中两个基一起形成亚烷基，X 代表磷或氮原子

在烷基或芳烷基中, 烷基是指含1-22个碳原子的直链或支链基团, 最好是含1-6个碳原子。芳基或烷芳基的芳基是指含6-10个碳原子的芳香基, 特别优选的是苯基或萘基。芳烷基中优选苄基,

亚烷基是含4-6个碳原子的饱和或不饱和碳链, 两个端连于X上的4或5碳链最好, 具有通I的阳离子可以含两个这种亚烷基, 但最好只含一个亚烷基。

在通式I中X最好代表氮原子。微溶性杂多酸盐中的优选阳离子也可以是由含一个季氮原子的芳香杂环化合物的基团形成的阳离子, 例如其氮原子上有烷基、芳基或芳烷基在此情况下, 上述对通式I中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 的定义仍然适用。

本发明涉及的微溶性杂多酸盐可以通过杂多酸与相应的碱性物质反应得到。为此, 至少一种物质是以溶液形式使用, 最好是水溶液。同时, 两种盐也可以以固体的形式加到一种液体中去, 尤其是亲水性液体或反之亦然。

被分析物代表待测物质。本发明特别适用于溶于液体特别是含水液体中的物质。微溶性杂多酸盐特别适用于测定液体中的物质, 例如血液、血清、血浆、尿或唾液。据此, 可能的被分析物是葡萄糖、胆固醇、乳酸、NADH或乙醇。理论上讲, 所有这些物质都可以用本发明所述的方法测定, 因为从氧化还原电位和动力学的角度来看, 这些物质本身或它们经与一种或几种其他化合物反应生成的物质都能在几秒或几分钟内(最好不超过三分钟)。将微溶性杂多酸蓝还原成杂多蓝令人惊奇的是富电子芳香胺具有上述功能。总之, 令人惊喜的是按上述步骤, 有可能得到一种不受其他还原物质干扰的测定方法。

很清楚，富电子芳香胺是一种电荷密度大于苯胺的化合物，因此其还原能力强于苯胺。富电子芳香胺类的氧化还原电位低于0.6V与正常氢电极相比最好小于0.4V。氧化还原电位大小本身并不起决定作用。而重要的是各物质能在3分钟左右将微溶性杂多酸盐还原成多杂蓝。例如，所有的苯胺衍生物都被认为带有一个或更多的+I或+M取代基，例如羟基、烷基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、单烷取代胺基和二烷取代胺基。

烷基、烷氧基、烷硫基、单烷氨基和二烷氨中的烷基代表含1-6个碳原子的烃基，此烃基本身又可被羟基、氨基取代，需要时还可被下述基团一次或多次取代：含1-6个碳原子的烷基， $\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $\text{SO}_3\text{H}$ 或 $\text{CO}_2\text{H}$ 取代。酸残基 $\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $\text{SO}_3\text{H}$ 和 $\text{CO}_2\text{H}$ 可以原形式存在或以盐的形式存在，例如，铵、碱金属盐或碱土金属盐。

烷氧基和烷硫基是指含有6-10个碳原子的基团，其中苯氧基和苯硫基是特别优选的。

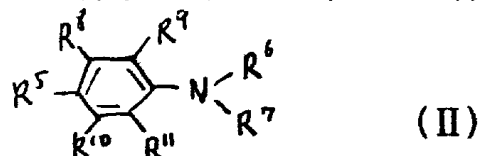
可以理解为苯胺衍生物的化合物是：在与一个或多个芳香环和/或脂环稠合的芳环系带有一个未取代氨基或带有一个或多个烷基取代的氨基的苯胺衍生物。为此，可将碳-芳环系及杂芳环系都考虑做芳香环。例如稠合苯并环或萘环或稠合吡啶环。

脂环是指含有5-7碳原子，最好是5或6碳原子的饱和或不饱和环化脂烃类。

氨基上的可能的烷基取代基可以是含有1-6个碳原子的烃基，该烃基又可以被羟基、氨基取代，如有必要还可以被下述基团一次或多次取代：含1-6碳的烷基、 $\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $\text{SO}_3\text{H}$ 及 $\text{CO}_2\text{H}$ 。酸基 $\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $\text{SO}_3\text{H}$ 及 $\text{CO}_2\text{H}$

可以其原形式存在，或者以盐形式存在，例如铵、碱或碱土金属盐。

最适合富电子芳香胺是那些通式II的化合物：



式中 $R^5$ 代表羟基或氨基，其中氨基需要的话可以被一个或二个烷基所取代；然而烷基如果需要又可以被羟基或取代氨基取代，必要时这个烷基还可以是一次或多次被另外的烷基、 $PO_3H_2$ 、 $SO_3H$ 或 $CO_2H$ 取代。

$R^6$ 和 $R^7$ 可以相同也可以不同，它们代表羟基或烷基，其中烷基如果可能可以被羟基或取代氨基取代，如有必要该烷基又可被烷基、 $PO_3H_2$ 、 $SO_3H$ 或 $CO_2H$ 一次或多次取代，

$R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 可以相同也可以不同，代表羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、芳氧基、芳硫基、卤素、羧基、烷基羧基或烷氧羰基。

烷基以及烷硫基、烷基羧基和烷基羰基中的烷是指含1-6个碳原子的烃基，最优选的是含1-3个碳原子的基团。

烷氧基中的烷基也是指含1-6个碳原子的烃基，其中碳原子为1-3的烃基最适用。芳氧基和芳硫基的芳是指含6-10个碳原子的芳基，其中酚基和酚硫基最好。卤素是指氟、氯、溴或碘，其中氯和溴最适宜。

酸残基 $PO_3H_2$ 、 $SO_3H$ 或 $CO_2H$ 可以其原有的形式存在，也可是其铵、碱或碱土金属盐。

胺盐指的是含有铵离子 $NH$ 的盐或含有指被烷基、芳基或芳烷一次或多次取代了的铵正离子的盐。烷基、芳烷基中的烷基是指含有1-6个碳原子的烃基。芳基和芳烷基中的芳基指的是含有6-10个碳原

子的芳环系，其中优选的是苯基。优选的芳烷是苄基。

最适宜的碱金属盐为锂盐、钠盐或钾盐，最适宜的碱土金属盐为镁盐或钙盐。

借助形成杂多蓝，用微溶性杂多酸盐可直接测定富电子芳香胺。用相似的方法同样也能测定那些经化学或酶催化反应定量生成富电子芳香胺的物质。可使用的物质还有，例如象那些作为反应物之一它本身已经含有富电子芳香胺的骨架，当它们与被分析物进行化学或酶催化反应时能释放出富电子芳香胺。这些化合物最好是那些经过水解后就能释放出富电子芳香胺的化合物，例如富电子芳香胺的酰胺、酯或葡萄糖甙类，可用此方法测定的被分析物最好是那些能催化适宜底物转化成富电子芳香胺的酶，特别是能破坏酰胺键和/或肽键的水解酶，能打开羧酸、磷酸或硫酸酯键的酶，能打开葡萄糖甙键的酶以及象 $\alpha$ -谷酰转移酶那样能促进基团转移的酶。

此外还有一些物质，它们能被酶催化氧化，其氧化产物在被还原后又能产生富电子芳香胺，所以这类物质也可以被测定。已知的氧化还原酶很多，它们都能有选择地识别存在于体液如血液、血浆、尿或唾液中的特定的物质并在有电子受体物质存在的条件下将这些物质氧化。

可以举例的黄素依赖性氧化酶有；L-和D-氨基酸氧化酶、胆固醇氧化酶、葡萄糖氧化酶、甘油-3-磷酸酯氧化酶、乳酸氧化酶或丙酮氧化酶，NAD(P)依赖性脱氢酶有：吡咯并喹啉-酮葡萄糖脱氢酶或心肌黄酶(NADH: 染色一氧化还原酶)。

就氧化还原酶而言，尤其是氧化酶和非NAD(P)依赖性脱氢酶，可

以使用酶催化氧化电子受体通过酶底物的酶催化氧化反应，可将这些受体还原成富电子芳香胺。用此方法可检验和测定那些被酶催化氧化了的物质，因为此方法中产生的富电子芳香胺与微溶性杂多酸盐作用时也能生成杂多蓝。

在上述方法中，在本发明范围内的最适用的电子受体为芳香亚硝基化合物，肟和羟胺，尤其适用的是那些欧州专利申请书EP-A-0354441中所提及的亚硝基化合物及肟。

按本发明方法为了借助形成杂多蓝来测定分析物，只要将被分析物与上述物反应使之转化成富电子芳香胺，然后再将此胺与杂多酸的微溶性盐接触即可。如果被分析物本身就是一种富电子芳香胺，那么它就可以直接与微溶性杂多酸盐作用而不需预先进行化学或酶催化反应。

一般来讲，与杂多酸盐作用的富电子芳香胺至少要以溶解的形式存在，最好是水溶液形式存在，例如，水、缓冲液或体液。如果待测的被分析物本身不是一种富电子芳香胺，那么，那些必需用来与被分析作用产生富电子芳香胺的化合物最好也能溶解于水溶液中。这些化合物可在与微溶性杂多酸盐作用之前加到样品中，但也可以是使其与被测样品一起和微溶性杂多酸盐作用或者在最后一步使其与微溶盐作用。根据具体情况选择次序或者由专家根据自己的专业技术知识和几次优选试验来确定。产生富电子芳香胺所需的物质可以以固体或溶解的形式加到水性样品中去。

能与待测被分析物作用产生富电子芳香胺的物质，必须以足够剂量加进样品中，以确保被分析物与之反应完全。最好使用2-10倍的剂

量。

微溶性杂多酸盐可以以固态与到待测样品作用。它也可以是悬浮液，最好是水性悬浮液，在需要测定时再将此悬浮液与样品混合。当待测的被分析物存在时就会有微溶于水的杂多蓝生成，借助于强烈的颜色可进行检测。为了能定量测定，可先用例如离心的方法把微溶性杂多蓝以及未反应的杂多酸盐从水溶液分离出来，再将它们溶解在合适的溶剂中如二甲亚砷中，用光度法测定杂多蓝染料的浓度，对照标准溶液或标准曲线可最终测定出需测被分析物的浓度。必须采用足够大量的微溶性杂多酸盐，以使存在于样品中(或形成)的富电子芳香胺所诱发的杂多蓝生成与待分析物或富电子芳香胺呈定量相关。理论上讲，微溶性杂多酸盐的用量要符合下述要求：即胺量增加，生成的杂多蓝量也会增加，杂多蓝的增加量要达到与富电子芳香胺的最高相关浓度。

本发明所述借助生成杂多蓝来测定被分析物的试剂含有能与被分析物作用产生富电子芳香胺的物质，另外还含有微溶性杂多酸盐。可以混悬液或冻干物、粉来混合物的形式使用这类试剂或也可以将它压成片。这些组成可以相互挨着或分开，它们都被加工成最有利的形式。本发明所述的试剂可以不含微溶性杂多酸盐本身，但可以含几个单独的成分，这些成分是制备微溶性杂多酸盐所需要的，即杂多酸和阳离子或碱性化合物，当需要进行测定时立刻将它们两个混合，就可得到相应的杂多酸微溶盐。如果本发明所述的试剂含有细分散形式的微溶性杂多酸盐以使其具有很大的反应表面，这将是十分有利的。如果需要，本发明所述的试剂还可含有其它试剂，例如，缓冲剂和辅助剂，

如润湿剂、稳定剂、增效剂等。如果待测的被分析物本身就是一种富电子芳香胺，当然就不需要那些与被分析物作用生成富电子芳香胺的试剂了。

用一种所谓干试法可以方便地按本发明所述对被分析物进行测定。专家可从下述专利中获得适用于干试法的测定装置 EP-A-0 016387、DE-A-32 47608、EP-A-0 262445或 EP-A-0 256806。这些装置统称为检测载体。使用干试法时，检测所需要的试剂都是干的，即它们不是溶于液体中，而是浸在或涂在一种吸附物上，这种吸附物可是纸，EP-A-0 016387 所述的开放膜、玻璃纤维或多孔塑料膜等，也可以浸在或涂在象塑料膜、凝胶或纤维之类能膨涨的材料上。

在检测载体上加液体样品或将检测载体浸在液体样品中时，检测载体内就形成一个液态环境，检测反应就在此环境中进行。检测反应所产生的颜色可以目测，也可以用反射光度计测定。

为将本发明所述的试剂制成载合形式，需将适当的载体材料如滤纸、纤维素、或塑料膜，在制备检测载体所需的试剂溶液或悬浮液浸渍，溶解这些试剂所需的溶剂应是高挥发性的，例如水、甲醇、乙醇、丙酮等。浸泡通常要分几步进行，也都很方便。每次用于浸泡的溶液或悬浮液都含有成品试剂中的一种成分。例如：第一步先把微溶性杂多酸盐的悬浮液加在载体材料上，第二加上步再将能与被分析物作用产生富电子芳香胺的物质的溶液，需要时溶液中可以加上缓冲液和其他添加物。经过这样处理过的载体材料就可以使用了，或者为了便于操作，还可以将载体粘在一个盒里或一个塑料片上。

除了将同一个载体料浸上多种试剂外，还可以将本发明所述的几

种试剂分散在不同的载体材料上，需测定被分析物时该载体材料彼此接触并能使流体彼此交换。

制备载合式检测试剂除了用浸渍法外，也可将溶液制成膜，即可用聚合物或聚合分散物配成的溶液，这种溶液很稠可用已知的刀涂或滚涂的方法制成薄膜。必要时粘稠溶液中还可加入缓冲物和添加剂。将此溶液涂在载膜上干燥成膜，最后再将成品膜制成检测用条。

检测载体的实例如图1和图6所示。其他的图2-5和图7示出了百分反射率与时间、波长或被分析物浓度的相关曲线，这些浓度是用图1或图6所示的检测载体测得的。

#### 图解

图1 优选检测载体的截面图

图2 样品a)-f)加在如图2所示的检测载体后，样品的百分反射率与时间相关曲线，样品a)-f)的葡萄糖浓度不同。

图3 不同浓度的葡萄糖样品a)-f)的百分反射率与波长(nm)的相关曲线，所采用的载体如图1所示。

图4: 百分反射率与葡萄糖浓度的相关曲线，测定用载体如图1所示。

图5: 百分反射率与NADH的浓度的相关曲线，测定用载体如图1所示。

图6: 更优选检测载体的截面图

图7: 百分反射率与乙醇浓度的相关曲线，测定用载体如图6所示。

下述实施例叙述了借助生成杂多蓝测定被分析物时方法上的几种可能的变化。这些变化并不构成对本发明所述方法的限制。下述实施例中还会对上图作进一步解释。

#### 实施例1

### 用18-钼二磷酸检测葡萄糖

按图1所示制备检测载体,此载体是以350 $\mu$ m厚的聚酯膜(Melinex. ICI. Frankfurt, 民主德国)为基膜(1)并且尺寸为2 X 3cm。中央有一直径为6mm的小孔,将由200 $\mu$ m厚的透明聚碳酸酯膜(5) (Pokalon. Lonza Rheinfelden, 民主德国), 第一试剂层(4)及第二试剂层(3)组成的试剂载体(6)采用传递粘合剂(2)固定在前述基膜的孔上,通过这种方式使液体样品先穿过该孔与第二试剂层接触。

试剂载体(6)的制法如下:

第一试剂层:

130g 重蒸水

36.3g 2%(重量)的Xanthan (Keltrol F. Kelco. Oklahoma. USA)  
的0.2M的柠檬酸盐缓冲液, PH=7.0

69g Propiofan 70D (BASF. Ludwigshafen 民主德国)

15ml 15%(重量)的壬基硫酸钠水溶液

6g 聚乙烯吡咯酮(Kollidon 25, BASF. Ludwigshafen 民主  
德国)

3.9g 四丁基氯化铵

12g 18-钼二磷酸(按G. Brauer“无机化学制备手册”一书,  
Enke出版 Stuttgart. 1954 制备)在15g水中

63g Celatom MW 25 (Eagle Picher, Cincinnati, Ohio USA)

将上述成分一起搅拌均匀涂在透明膜(5)上,涂厚150微米。在60 $^{\circ}$ C下干燥1小时。

第二试剂层:

- 20g 重蒸水
- 16g 二氧化钛RN56 (KronS-Titan GmbH Leverkusen. 民主德国)
- 36.3g 12%(重量) 的 Keltrol F (Kelco. Oklahoma USA) 在0.2M的柠檬酸盐缓冲液中PH=6.0
- 69g Propiofen 70D (BASF Ludwigshafen. 民主德国)
- 15ml 15%(重量) 的壬基硫酸钠水溶液
- 6g Kollidon 25 (BASF Ludwigshafen. 民主德国)
- 188g 水
- 63g Celatom MW 25 (Eagle-Picher Cincinnati Ohio. USA)
- 400mg N. N-二-(2-羟基乙基)-P-亚硝基苯胺盐酸盐溶于20g水中
- 2g 葡萄糖氧化酶(200u/ml) 在12g水中

将上述成分一起搅拌均匀, 刀涂在第一试剂层上, 厚度400微米, 轻轻吹去气泡在60°C下干燥1小时。

当时间 $t=0$ 时, 将葡萄糖含量为 a) 0 mg/dl、b) 47.5mg/dl、c) 108.7mg/dl、d) 200.8mg/dl、e) 392.3mg/dl和f) 766mg/dl的人血浆样品分别加在各个按上述方法制备的检测载体上, 8秒钟后测量它们在950nm处的百分消光值, 以后每隔4秒钟测量一次。用测量的消光值(R)对时间(t)作图可得一条如图2所示的曲线。在第一次测定时颜色形成就已经完成, 消光值也不再增加。所以在第一次测定后的任何时间内都测得稳定的终点结果。

用不同波长的光测定含葡萄糖为 a) 0mg/dl、b) 100mg/dl、c) 240mg/dl和d) 800mg/dl的血样, 所用检验载体与图2相同, 用测得的百分消光值 (R)对波长 ( $\lambda$ )作图得到如图3所示的曲线, 曲线显示在

550nm至1100nm以上之间的任一波长都可用来测定葡萄糖的浓度, 结果还表明波长的变化容限很宽。

## 实施例2

### 用18-钼二磷酸盐测定葡萄糖的专一性

将表1 所列的干扰物按给定浓度加到含葡萄糖为 a) 0mg/dl (CGluc=0) 和b) 110mg/dl (CGluc=110mg/dl) 的人血浆中。如果用实施例1中所述并制得的图1所示检测载体测定上述人体血样, 那么样品在66nm的百分消光值列于见表1。

表1

干扰物质	最终浓度	CGlu=0	CGlu=110mg/dl
		%R	%R
无(对照)	0	60.3	43.0
NaOH	1mm	59.9	42.5
尿酸	10mf/dl	59.5	42.4
	20mg/dl	60.1	42.4
乳酸盐	100mg/dl	59.7	43.2
	300mg/dl	60.2	42.8
胆红素	10mg/dl	60.0	42.7
	20mg/dl	61.5	43.0
谷酰甘肽	1mM	59.3	43.0
	5mM	59.4	43.8
甲基多巴	10mg/dl	59.5	43.1
	100mg/dl	59.0	42.1
dobesulate	20mg/dl	59.4	41.8
龙胆酸	50mg/dl	59.6	43.0
阿司匹啉	5mg/dl	59.9	42.1
	60mg/dl	60.0	42.0

在与葡萄糖浓度无关的人体血样(0和110mg/dl)中未发现有明显的干扰。

采用图1 所示检测载体(其中该载体按实施例1方法制备并与之相同, 其不同之处是在对照载体中省去了氯化四丁铵)所得的结果呈现出极大的分散性和极差的可重复性, 其原因是所采用的18-钼二磷酸

在PH等于5.5时发生分解所致。此外还原性物质额外生色也会产生干扰。

### 实施实例3

#### 基于12-钼酸盐的用于测定葡萄糖的检测载体

如果将实施例1所述方法中的18-钼二磷酸用等量的12-钼酸盐(Fluka, Buchs, 瑞典)代替可制得一种检测载体, 这种载体在葡萄糖存在下显色能力较弱, 所以它特别适用于测定高浓度葡萄糖。采用各种不同样品, 但其浓度已知(c) 在650nm处测定其百分消光值(R)可得到图4所示的曲线。如果在950nm处测得的曲线与图4相同。

用12-钼酸盐(V)、18-钼酸盐(V)、11-钼-1-钒酸盐、10-钼-2-钒酸盐和9-钼-3-钒酸盐都能得到相似的结果, 上述杂多酸盐都可按B. Brauer“无机化学制备手册”一书, 出版者Enke, Stuttgart (1954), 中的方法制备。表2列出了一些杂多酸的名称及分子式, 还列出了相应杂多蓝的最大吸收值。

表2

#### 不同杂多酸生成的杂多蓝

起始物	分子式	杂多蓝的最大吸收
12-钼磷酸	$H_3 (PMo_{12}O_{40}) \times nH_2O$	725nm
18-钼二磷酸钠	$Na_6 (P_2Mo_{18}O_{62}) \times 42H_2O$	693nm
12-钼砷酸钾(V)	$K_3 (AsMo_{12}O_{40}) \times nH_2O$	840nm或652nm (a) (b)
18-钼二砷酸钠(V)	$Na_6 (As_2Mo_{18}O_{62}) \times 23H_2O$	672nm
11-钼-1-钒磷酸	$H_4 (PMo_{11}VO_{40}) \times nH_2O$	665nm
10-钼-2-钒磷酸	$H_5 (PMo_{10}V_2O_{40}) \times nH_2O$	620nm
9-钼-3-钒磷酸	$H_6 (PMo_9V_3O_{40}) \times nH_2O$	780nm

a: 少量还原剂(葡萄糖)

b: 大量还原剂(葡萄糖)

## 实施例4

### 测定NAD(P)H的检测载体

用等量的心肌黄酶代替实施例1中的葡萄糖氧化酶可制得一种测定NAD(P)H的检验载体。测定几个已知NADH浓度的样品在660nm处的百分消光率可得如图5所示曲线,此曲线可作为标准曲线来测定未知样品中NADH的浓度。

用NAD(P)依赖性脱氢酶、相应底物和NAD(P)制备NAD(P)H的方法是已知的。所以经过一步适当的初反应后,就可以用NADH检测载体测定脱氢酶底物或该脱氢酶本身。

## 实施例5

采用醇脱氢酶和心肌黄酶及18-钼二磷酸盐测定乙醇用的检测载体

### a) 检测载体的制备

制做如图6所示检测载体。以这种方式构成的该检测载体其指示剂系统是由下述成份组成的均匀混悬体:

- 4ml 0.2M的柠檬酸盐缓冲液, PH=6.0
- 10ml 10%(重量)的壬基硫酸钠水溶液
- 60mg 酒石黄
- 0.1g N, N-二-(2-羟基乙基)-P-亚硝基苯胺盐酸盐
- 6.8ml 20%(重量)的18-钼二磷酸水溶液
- 1g 25%(重量)的四丁基氯化铵水溶液
- 72g 含重量5%的Kollidon 25(BASF, Ludwigshafen民主德国)的50mM柠檬酸盐缓冲液, PH=6.)

将上述混悬液浸渍于吸收纸上(Langfaser, Schoeller, Germsbach,

民主德国) 然后于40°C干燥30分钟。

酶类加在另一张纸上((Langfaser, Schoeller, Germsbach, 民主德国)。将该纸用下述溶液浸渍, 然后在40°C下干燥20分钟, 溶液的组成为:

50g	0.2M磷酸盐缓冲液PH=7.0
48g	水
2ml	10%(重量)的壬基硫酸钠溶液
6g	心肌黄酶(15 $\mu$ /ml冻干物)
2g	醇脱氢酶(250 $\mu$ /ml冻干物)

将上述制作的指示纸(13)和酶纸(12)均剪成14 X 6mm的小条。

一条长16mm, 宽6mm, 0.25mm厚面积重量为25g/m<sup>2</sup>的玻璃纤维作传递纤维(14), 一条6mm长, 6mm宽, 700  $\mu$ m厚, 面积重量为60g/m<sup>2</sup>的玻璃纤维(15)用来分离红血球膜, 用Scrynel PE280HC red (Zürcher, Beuteltuchfabrik AB, Rüslikon, Switzerland) 制一条6 X 8mm, 并带有孔径280  $\mu$ m的保护网膜(16), 按图6所示膜用热固胶粘条(18)将上述三条膜贴在一个厚350  $\mu$ m, 长9.8cm, 宽6mm的聚酯膜上(Mlinex, ICI, Frankfurt, 民主德国)。用热固胶粘条(19)将指示纸(13), 酶纸(12)和一条厚200  $\mu$ m, 长15mm, 宽6mm的透明聚碳酸酯膜(11) (Pokalon, Lonza, Rheinfelden, 民主德国)贴一个载膜(17)上, 贴的时候(11)、(12)、(13)不能接触, 只有加压或当传递层(14)中充上液体时它们才能相接触。

#### b) 乙醇的测定

将32  $\mu$ l血样加在检测载体的保护网(16)上, 所用检测载体是按a)

中方法依图6所示制做的。60秒钟后将酶纸(12)和指示纸(13)压在有血清的传递纤维(14)上,120秒钟后测定透明膜(11),在640nm处的百分消光值。通过对几个乙醇浓度不同的已知血样的测定可得到一条如图7所示的曲线,此线可做为标准曲线,用来测定未知样品中的乙醇含量。

### 实施例6

#### $\beta$ -半乳糖甙酶的测定(EC3.2.1.23)

配制下列溶液

- 缓冲液: 0.1M的Hepes, 20mM的氯化镁, PH=6.8
- 基质: 50mM的对氨基苯基- $\beta$ -半乳糖甙(按“有机制备”一书, VEB. Deutscher Verlag der Wissenschaften, 第15版, 柏林1976, 的方法, 将对硝基苯基- $\beta$ -半乳糖甙经钨-碳催化氢化还原制得)
- 中和液: 1N的氢氧化钠溶液
- 指示剂: 100mg/ml 18-钼二磷酸, 50mg/ml 苯基三甲基氯化铵水溶液
- 酶: 180 $\mu$ /ml在缓冲液中(所给定的酶活性与采用邻硝基苯酚半乳糖甙作为底物相关)

将下列溶液在一反应器中混合以备试验之用。

缓冲液 780 $\mu$ l

指示剂 100 $\mu$ l

中和液 20 $\mu$ l

基质 100 $\mu$ l

酶 a)0, b)1 $\mu$ l, c)2 $\mu$ l, d)3 $\mu$ l, e)4 $\mu$ l, f)5 $\mu$ l。

保温4分半钟后, 离心半分钟, 弃去上清液, 沉积物溶解于1毫升二甲亚砷中, 立即测其吸光率(A) 结果如表3

表3

$\mu$ l 酶	$\mu$ /ml 酶	A (800nm)
0	0	0.065
1	0.18	0.571
2	0.36	1.245
3	0.54	1.697
4	0.72	2.350
5	0.90	2.907

由表3数据得到的标准曲线, 可用来测定未知样品中 $\beta$ -半乳糖甙酶的含量。

### 实施例7

#### 碱性磷酸酯酶的测定 (EC3.1.3.1)

如果按照实施例6采用50m的对氨基苯基磷酸酯(按文献De Riemer, C. F. Meaares, Biochemnstry, 20, 1606 (1984) 方法制备)作底物, 用1M的二乙醇胺, 1mM的氯化镁和0.1mM的氯化锌作缓冲液, PH=9.8, 那么此方法就可用来测定碱性磷酸酯酶。与实施例6相同, 用已知浓度的样品可测得酶浓度与在800nm处的吸光率的线性关系。

### 实施例8

#### 用于测定 $\gamma$ -谷酰基转移酶的检测载体

按类似实施例1所述的方法经制得一种检测载体, 但有如下变更:  
在第二试剂层中, 用重量2%的 Keltrol F水溶液代替原来的缓冲液(重量2%的 Keltrol F 在0.2M的柠檬酸盐缓冲液中), 并去掉N. N-二-(2-羟基乙基)-对亚硝基苯胺盐酸盐和葡萄糖氧化酶。然后再在透明

胶(2)与第二试剂层(3)之间插入一片按如下方法制得的用基质浸过的纸:

在含250mM双甘氨酸和20mM  $\gamma$ -L-谷酰基-3-羧基-1.4-苯二胺(按EP-A-0103823制备)的250mM Tris 缓冲液(PH=7.6)中浸渍一片茶袋纸(12g/m<sup>2</sup>),取出在50°C下干燥20分钟即可。

在含10mg/ml牛血清白蛋白的0.1M Tris 缓冲液 (PH=7.5)中配制 $\alpha$ -谷酰转移酶一系列稀释液。取10  $\mu$ l该稀释液加在按上述方法制得的检测载体上,一分钟后测得了在37°C下,在950nm处的百分消光值,结果见表4

表4

酶浓度 $\mu$ /ml	在950nm处的消光值%
0	59.0
0.245	57.0
0.471	55.5
1.31	52.7
2.77	49.7
4.93	45.8
7.39	42.2
9.85	39.0

按表4数据得到的曲线,可用于测定未知样品中的 $\alpha$ -谷酰转移酶的含量。

#### 实施例9

用于测定酸性磷酸酯酶的检测载体(EC 3.1.3.2)

与实施例8相似,将所述茶袋纸用10mM的对氨基苯基磷酸酯的0.1M柠檬酸盐缓冲液(PH=5.0)浸渍,就可得到一种用于测定酸性磷酸酶的检测载体。

# 说明书附图

图 1

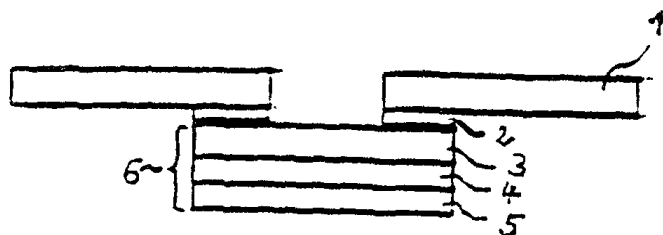


图 2

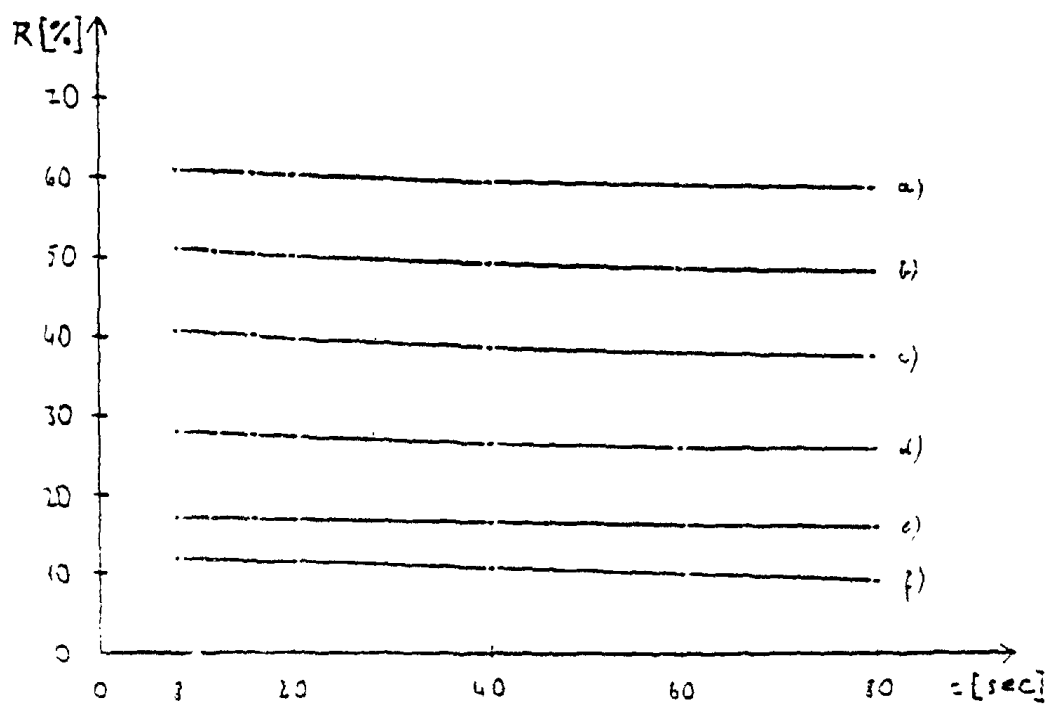


图 3

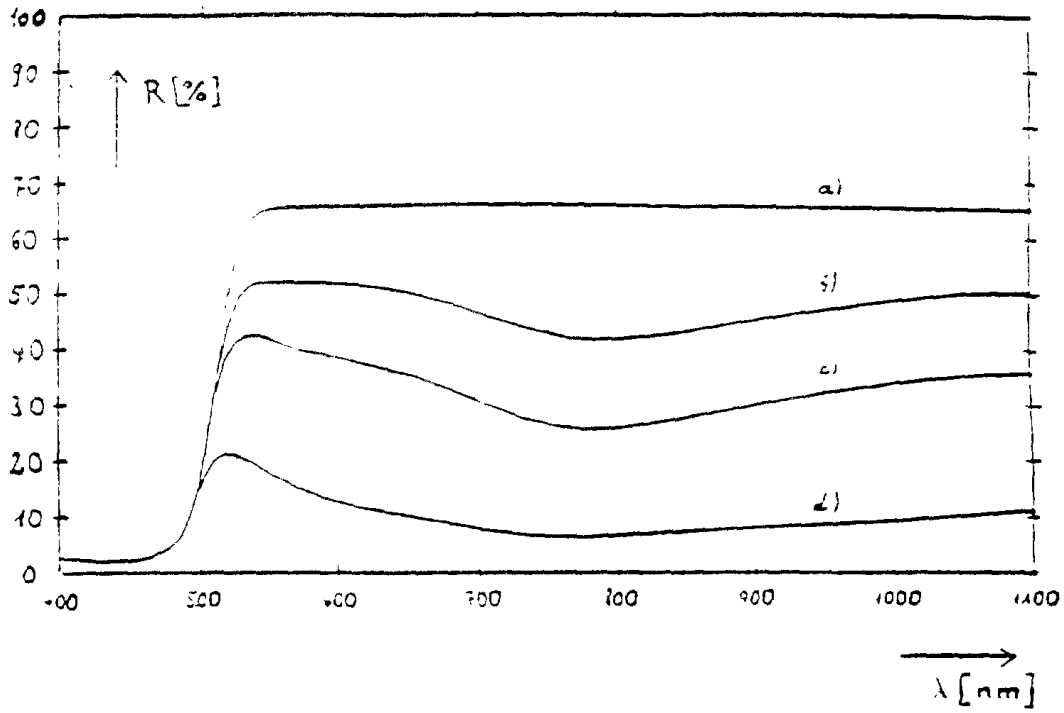


图 4

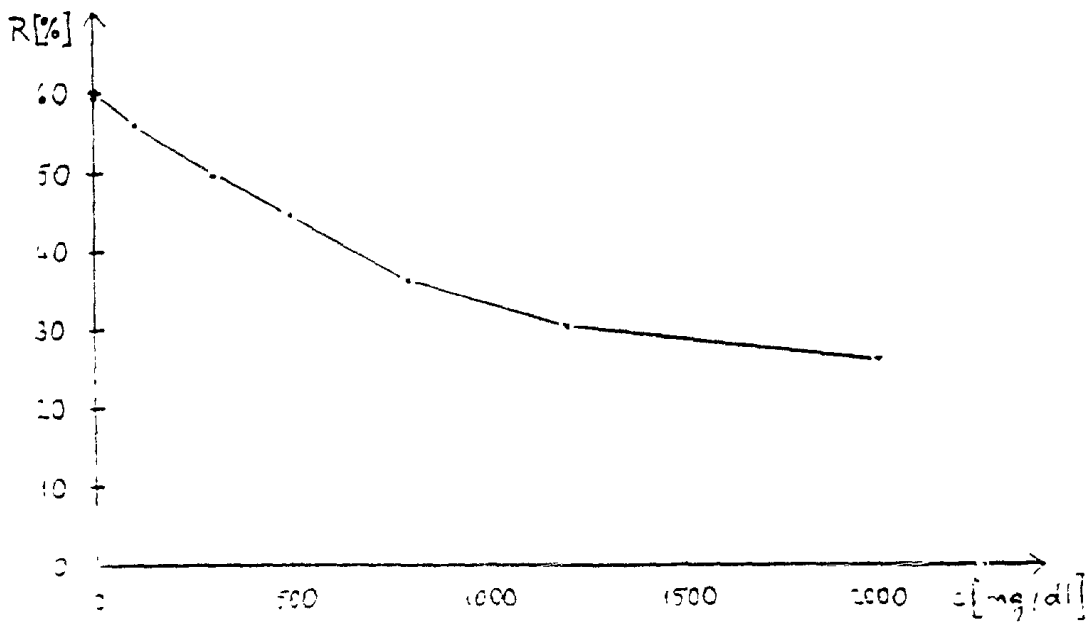


图 5

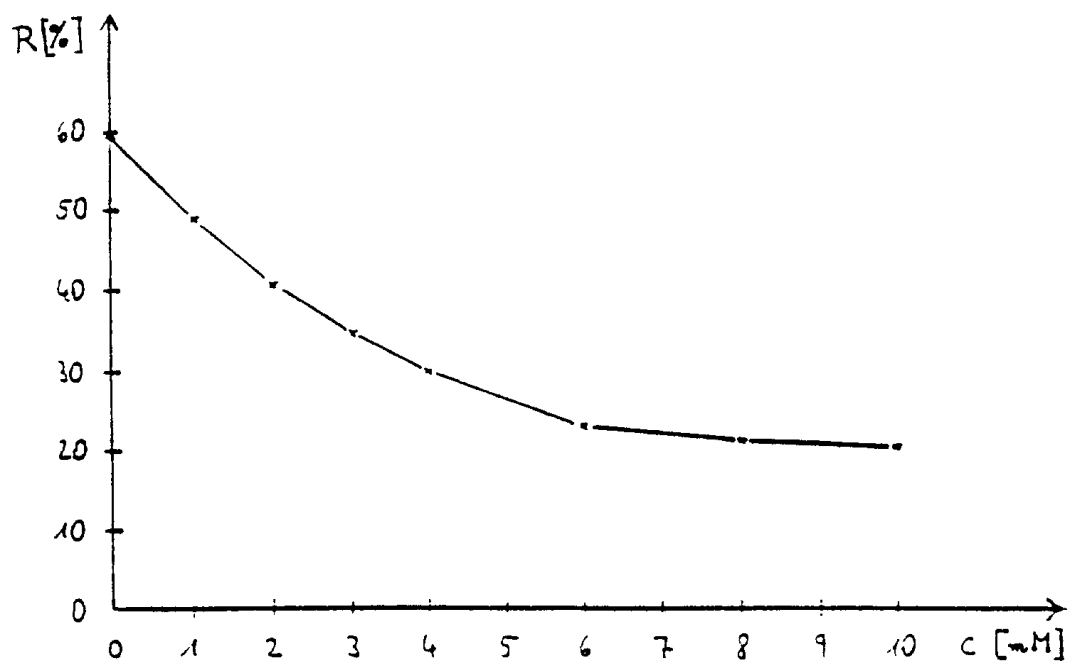


图 6

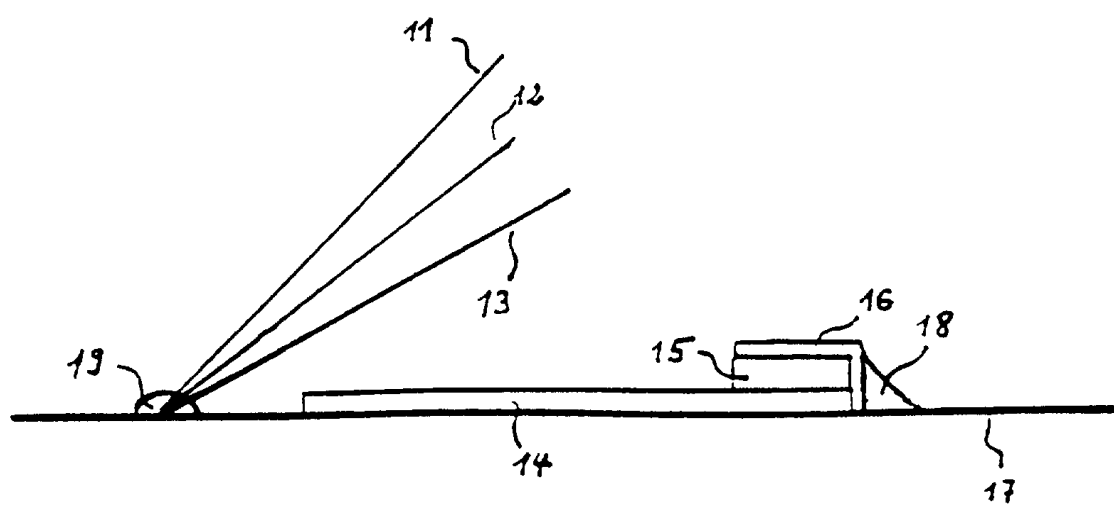


图 7

