

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101558296 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 11

(21) 申请号 200780046209. X

G01N 33/48 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 12. 13

C12M 1/40 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/26 (2006. 01)

336789/2006 2006. 12. 14 JP

C12Q 1/32 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2009. 06. 15

CN 1257128 A, 2000. 06. 21,

(86) PCT申请的申请数据

CN 1257128 A, 2000. 06. 21,

PCT/JP2007/074047 2007. 12. 13

US 6540891 B1, 2003. 04. 01,

(87) PCT申请的公布数据

JP 10062402 A, 1998. 03. 06,

W02008/072702 JA 2008. 06. 19

CN 1281980 A, 2001. 01. 31,

(73) 专利权人 日本化药株式会社

CN 1190188 A, 1998. 08. 12,

地址 日本东京

US 4994377 A, 1991. 02. 19,

(72) 发明人 梅香家佳彦 町田礼子 高木久子

US 5486458 A, 1996. 01. 23,

入江弥生 横山贵男 田边敏雄

JP 6007197 A, 1994. 01. 18,

JP 7067697 A, 1995. 03. 14,

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

JP 2002514744 A, 2002. 05. 21,

审查员 黄斌

代理人 陈海涛 樊卫民

(51) Int. Cl.

G01N 27/416 (2006. 01)

G01N 27/327 (2006. 01)

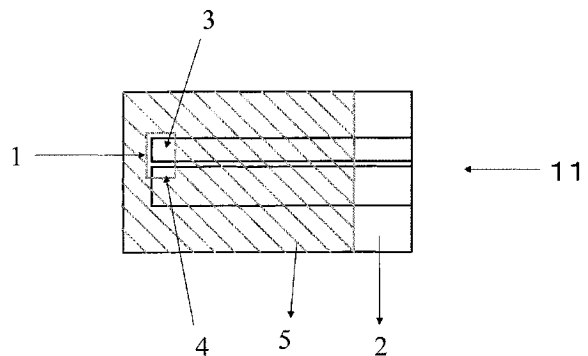
权利要求书2页 说明书33页 附图18页

(54) 发明名称

用于测定全血中的 1,5- 脱水葡萄糖醇的方法以及用于所述方法的传感器芯片和测定试剂盒

(57) 摘要

本发明通过一种测定 1,5- 脱水葡萄糖醇的方法,可以使用少量全血测定 1,5- 脱水葡萄糖醇而无需借助于离心机等,所述方法包括下列步骤:预先消除或转化干扰 1,5- 脱水葡萄糖醇测定的葡萄糖和 / 或其衍生物;然后进行测定 1,5- 脱水葡萄糖醇,其中不进行血细胞分离而在原样全血中消除或转化这种葡萄糖和 / 或其衍生物,不进行血细胞分离而让用于测定 1,5- 脱水葡萄糖醇的酶发挥作用,以及电化学测定 1,5- 脱水葡萄糖醇。因此,这种测定方法能够用于在床边或医学检查室中 1,5- 脱水葡萄糖醇的快速测定或用于由患者在家中对其进行自测。



1. 一种测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,所述方法包括:

(1) 用酶消除或转化干扰测定的葡萄糖和 / 或其衍生物的步骤,其中不分离血细胞,使用原样全血,

(2) 不分离血细胞而让用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶发挥作用,以电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇的步骤。

2. 权利要求 1 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶是氧化还原酶。

3. 权利要求 2 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述氧化还原酶是吡喃糖氧化酶、L-山梨糖氧化酶或 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶。

4. 权利要求 3 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述氧化还原酶衍生自假单孢菌属或土壤杆菌属。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中在氧化还原介体的存在下,电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇。

6. 权利要求 5 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述氧化还原介体为钼络合物、醌化合物、二茂铁化合物、吩噻嗪化合物、吩噻啉化合物、吩嗪化合物、靛酚化合物、二苯胺化合物或酚化合物。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中在稳定剂的存在下,电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇。

8. 权利要求 7 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述稳定剂是 2-磺基苯甲酸或 3-磺基苯甲酸。

9. 权利要求 1 至 8 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中通过电流分析法、电量分析法或循环伏安法来电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇。

10. 权利要求 1 至 9 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中使用如下电极来电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇,该电极具有:用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极以及对电极,

所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含:用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶,以及氧化还原介体。

11. 权利要求 10 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中使用差分电极来电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇。

12. 权利要求 11 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述差分电极是这样的电极,它具有用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极、用于测定空白的工作电极和对电极,

所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含:用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶,以及氧化还原介体,

所述用于测定空白的工作电极包含氧化还原介体,但不含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶。

13. 一种用于权利要求 1 ~ 12 中任一项的电化学测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法中的传感器芯片,其包括如下电极,该电极由用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极以及对电极构成,

所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含：吡喃糖氧化酶或 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶,以及氧化还原介体。

14. 权利要求 13 的测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片,其还包括用于消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物的试剂。

15. 权利要求 13 或 14 的测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片,其包括差分电极,所述差分电极包括如下电极,该电极具有:用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极、用于测定空白的工作电极以及对电极,

所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含:吡喃糖氧化酶或 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶,以及氧化还原介体,

所述用于测定空白的工作电极包含氧化还原介体,但不含吡喃糖氧化酶或 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶。

16. 一种测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的试剂盒,其包括权利要求 13 至 15 中任一项的传感器芯片、用于采血的穿刺装置和 1,5-脱水葡萄糖醇的测定装置。

17. 权利要求 16 的测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的试剂盒,其还包括用于消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物的试剂。

用于测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法以及用于所述方法的传感器芯片和测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于测定血液中受到葡萄糖和 / 或其衍生物干扰的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,具体涉及电化学测定血液中的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法、用于测定的传感器芯片和包括所述传感器芯片的用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的试剂盒,所述方法的特征在于使用全血作为样本,并且不需要血细胞分离。

背景技术

[0002] 近年来,随着饮食变得更加丰富,糖尿病患者数目也在增加。为了预防糖尿病患者的并发症,血糖水平需要保持在接近健康人的水平,血糖水平自测装置被广泛使用,使得患者可以自己在家里监测血糖水平。然而,由于血糖水平随膳食而改变,并且测定需要频繁进行,因此患者遭受沉重的负担。对于患者而言,还由于缺乏知识而难以正确解释测定值,并且严格控制血糖水平也并不容易。

[0003] 同时,由于 1,5-脱水葡萄糖醇不受膳食影响并且反映糖尿病患者在过去一周内的血糖控制,因此糖尿病患者只要在家里通过“一周一次”测定就能够准确了解他们的血糖控制。1,5-脱水葡萄糖醇自测试剂盒将为患者提供极大好处,但使用血清或血浆作为样本来测定 1,5-脱水葡萄糖醇的常规方法需要血细胞分离而且不适合用于自测,因为测定需要大量的样本。因此,还没有实现 1,5-脱水葡萄糖醇自测试剂盒,包括使用痕量原样全血作为样本的自测试剂盒。

[0004] 专利文献 1 至 9 中所述的 1,5-脱水葡萄糖醇测定方法使用血清或血浆而不是全血作为样本,并且不涉及电化学测定。

[0005] 此外,当将全血样本用于由和光纯药工业株式会社 (Wako PureChemical Industries, Ltd.) 销售的动物用 1,5AG 试剂盒 (日本化药株式会社 (Nippon Kayaku Co., Ltd.)) 时,通过添加净化水或 10mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) 水溶液将血液溶解,再离心分离,用柱处理上清液,并通过使用色素的比色法测定 1,5-脱水葡萄糖醇。换句话说,这种方法不是在不分离血细胞的情况下使用原样全血作为样本以电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法。

[0006] 通常使用血清或血浆而不是全血作为样本的原因在于血细胞中还包含葡萄糖。即使当将用于消除或转化葡萄糖的试剂添加到全血中时,葡萄糖仍保留在血细胞中而未消除或转化。由于葡萄糖在测定血液中的 1,5-脱水葡萄糖醇的步骤中通过细胞膜释放,因此不能完全消除葡萄糖的干扰。在用于检测血液中的 1,5-脱水葡萄糖醇的反应中,预期会受到具有氧化-还原能力的红细胞中色素的干扰。到目前为止,通过预先酶促消除或转化葡萄糖而不分离血细胞,使用全血测定血液 1,5-脱水葡萄糖醇的方法是未知的。

[0007] 此外,电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法描述于非专利文献 1 及专利文献 10 和 11 中。然而,非专利文献 1 描述了使用由过氧化氢电极和酶固定膜组成的酶传感器测定尿中的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法。然而,没有提及在共存有葡萄糖等的全血中的 1,5-脱

水葡萄糖醇的测定。在专利文献 10 中,通过使用脱氢酶和吩嗪硫酸二甲酯作为电子受体的电流分析法测定 1,5-脱水葡萄糖醇。然而,只提到了 1,5-脱水葡萄糖醇的参比标准的例子,但没有关于在全血中测定的描述。在专利文献 11 中,使具有氧化 1,5-脱水葡萄糖醇的能力的酶发挥作用,并使用过氧化氢电极电化学测定所产生的过氧化氢。然而,该测定中也使用血清,这不是使用全血的测定方法。

[0008] 同时,1,5-脱水葡萄糖醇是作为在 1 位的还原葡萄糖的化合物并具有与葡萄糖极为相似的化学结构。因此,用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的许多酶也与葡萄糖反应。血液包含比 1,5-脱水葡萄糖醇高 20 倍或更多的葡萄糖。因此,要测定 1,5-脱水葡萄糖醇,必须通过某种方式消除或转化葡萄糖,以使葡萄糖不应与用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶反应。此外,当通过该转化产生的葡萄糖衍生物与用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶反应时,这些衍生物也必须被消除或转化。

[0009] 葡萄糖通过如下方式来消除或转化,在专利文献 1 中,用葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖或用己糖激酶将葡萄糖磷酸化;在专利文献 2 中,用葡萄糖氧化酶和葡糖酸内酯酶或葡萄糖脱氢酶和葡糖酸内酯酶氧化葡萄糖;在专利文献 3 和 4 中,用己糖激酶、己糖磷酸异构酶和 6-磷酸果糖激酶或葡萄糖异构酶、果糖激酶和 6-磷酸果糖激酶将葡萄糖转化成果糖 1,6-二磷酸;在专利文献 5 中,用葡萄糖激酶或己糖激酶将葡萄糖磷酸化;及在专利文献 6 中,用使葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸的酶将葡萄糖磷酸化,然后测定 1,5-脱水葡萄糖醇。在这些文献中,葡萄糖被转化为葡糖酸-1,5-内酯、葡萄糖-6-磷酸、葡糖酸、果糖-6-磷酸、果糖 1,6-二磷酸等。然而,到目前为止,通过用酶消除或转化全血中的葡萄糖,然后用酶电化学定量全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的测定法是未知的。

[0010] 专利文献 1:日本专利 2983015 号

[0011] 专利文献 2:JP-A-2001-78797

[0012] 专利文献 3:日本专利 3170320 号

[0013] 专利文献 4:日本专利 3217180 号

[0014] 专利文献 5:JP-A-2001-116756

[0015] 专利文献 6:日本专利 2872983 号

[0016] 专利文献 7:JP-A-63-185397

[0017] 专利文献 8:JP-A-10-191998

[0018] 专利文献 9:JP-A-8-70893

[0019] 专利文献 10:JP-A-7-67697

[0020] 专利文献 11:JP-A-62-79780

[0021] 专利文献 12:JP-A-5-304997

[0022] 专利文献 13:JP-A-63-22185

[0023] 专利文献 14:JP-A-2-268679

[0024] 专利文献 15:JP-A-2000-135079

[0025] 专利文献 16:JP-A-11-18760

[0026] 专利文献 17:JP-A-2000-175698

[0027] 专利文献 18:JP-A-10-179140

[0028] 非专利文献 1:Biomed. Chromatogr., vol. 7, p. 41 (1993)

发明内容

[0029] 本发明要解决的问题

[0030] 近来,对于临床实验室测试来说,称为即时检验 (Point of Care Testing) 的各种床边或门诊测试项目的快速测定和由患者自己在家中进行的血糖水平测定已经日益实施。由于在这样的情况下使用离心机获得血清或血浆是复杂的并且需要时间,因此在实际临床环境 (clinical setting) 中难以使用。尤其是,在由患者自己在家中进行的测定中,将使用穿刺装置和样品采集装置采集的例如不超过几十 μL 的痕量血液用作样品。因此,不能使用应用离心机获得血清的测定方法。由此,期待使用原样全血作为样本测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法。

[0031] 解决问题的方法

[0032] 本发明人为了解决上述问题进行了各种研究。结果,他们发现了使用原样全血作为样本电化学测定血液中 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,并且完成了本发明。

[0033] 也就是说,本发明涉及下列内容。

[0034] (1) 一种测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,所述方法包括消除或转化干扰测定的葡萄糖和 / 或其衍生物的步骤和测定 1,5-脱水葡萄糖醇的后续步骤,其中不分离血细胞而使用原样全血消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物,然后不分离血细胞而让用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶发挥作用,以电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0035] (2) 上面 (1) 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶是氧化还原酶。

[0036] (3) 上面 (2) 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述氧化还原酶是吡喃糖氧化酶、L-山梨糖氧化酶或 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶。

[0037] (4) 上面 (3) 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述氧化还原酶衍生自假单胞菌 (*Pseudomonas*) 属或土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 属。

[0038] (5) 上面 (1) 至 (4) 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中在氧化还原介体的存在下,电化学测定所述 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0039] (6) 上面 (5) 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述氧化还原介体为钌络合物、醌化合物、二茂铁化合物、吩噻嗪化合物、吩噁嗪化合物、吩嗪化合物、靛酚化合物、二苯胺化合物或酚化合物。

[0040] (7) 上面 (1) 至 (6) 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中不分离血细胞,用酶从原样全血中消除或转化所述葡萄糖和 / 或其衍生物。

[0041] (8) 上面 (1) 至 (7) 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中在稳定剂的存在下,电化学测定所述 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0042] (9) 上面 (8) 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述稳定剂是 2-磺基苯甲酸或 3-磺基苯甲酸。

[0043] (10) 上面 (1) 至 (9) 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中通过电流分析法、电量分析法或循环伏安法来电化学测定所述 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0044] (11) 上面 (1) 至 (10) 中任一项的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中使用具有用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极和对电极的电极,电化学测定所述 1,5-脱水葡萄糖醇。

糖醇,所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶和氧化还原介体。

[0045] (12) 上面 (11) 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中使用差分电极(differential electrode),电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0046] (13) 上面 (12) 的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其中所述差分电极是这样的电极,它具有用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极、用于测定空白的工作电极和对电极,所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶和氧化还原介体,所述用于测定空白的工作电极包含氧化还原介体但不含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶。

[0047] (14) 一种用于测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片,其包括具有用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极和对电极的电极,所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶和氧化还原介体。

[0048] (15) 上面 (14) 的测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片,其还包括用于消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物的试剂。

[0049] (16) 上面 (14) 或 (15) 的测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片,其包括差分电极,所述差分电极包括具有用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极、用于测定空白的工作电极和对电极的电极,所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶和氧化还原介体,所述用于测定空白的工作电极包含氧化还原介体但不含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶。

[0050] (17) 一种用于测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的试剂盒,其包括上面 (14) 至 (16) 中任一项所述的传感器芯片、用于采血的穿刺装置和 1,5-脱水葡萄糖醇的测定装置。

[0051] (18) 上面 (17) 的测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的试剂盒,其还包括用于消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物的试剂。

[0052] 本发明的有益效果

[0053] 根据本发明,由于可以使用全血作为样本电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇,并且血细胞不需要分离,因此测定变得简单而无需使用离心机等,这使得测定可由患者自己在家中进行。

[0054] 实施本发明的最佳方式

[0055] 下面,将详细解释本发明。

[0056] 本发明是电化学测定血液中受到葡萄糖干扰的 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,其特征在于,在测定血液中的 1,5-脱水葡萄糖醇时,使用全血作为样本而无需分离血细胞。具体地,本发明的测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法的特征在于,不分离血细胞,从原样全血中消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物,然后不分离血细胞而让用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶发挥作用,以电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇。如上所述,由于用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶也对作为底物的葡萄糖起作用,因此需要消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物以防止葡萄糖的干扰。

[0057] 在本发明的测定方法中,消除或转化葡萄糖和 / 或其衍生物的步骤和测定 1,5-脱水葡萄糖醇的步骤可以连续进行或与其间的其它步骤依次进行。

[0058] 本发明使用的全血是处于采集状态的血液,其血细胞未分离,并且可以包含用于

采血的采血管中所含的抗凝剂、糖解抑制剂等,例如肝素、氟化钠和一碘乙酸。当使用保存的血液时,优选通过含有氟化钠和肝素的采血管采血。另外,本发明的全血还包括不使用采血管等,而通过用于自测血糖水平的穿刺装置等采集的血液。采血部位没有特别限制,包括指尖以及前臂外侧、腹壁或上臂外侧。采血量为例如 50 μ L 或更少,优选为 0.1-30 μ L。更优选地,3-20 μ L 就足够了。

[0059] 将葡萄糖和 / 或其衍生物消除或转化为不干扰本发明测定的物质的步骤没有特别限制,只要它不影响血液中目标 1,5-脱水葡萄糖醇的测定即可。其例子包括专利文献 1 至 9 中所述的将葡萄糖和 / 或其衍生物消除或转化为不干扰测定的物质的方法。更优选使用酶的方法,其例子包括将葡萄糖酶促氧化或酶促磷酸化的方法。

[0060] 用酶消除或转化全血中的葡萄糖已经取得进展,而没有与上面提及的预期相反的问题,这使得能够如后面描述的实施例所示,测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0061] 用于酶促氧化葡萄糖的方法的例子包括:包括用葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖的方法、包括在辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) 的存在下,用葡萄糖脱氢酶氧化葡萄糖的方法。用于酶促磷酸化葡萄糖的方法的例子包括:包括用己糖激酶或葡萄糖激酶将葡萄糖磷酸化以转化成葡萄糖-6-磷酸的方法。根据用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的酶的类型,通过葡萄糖磷酸化产生的葡萄糖-6-磷酸可能需要进一步转化。在这种情况下,其例子包括:包括在辅酶 NAD⁺ 或 NADP⁺ 的存在下用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶将葡萄糖氧化成葡糖酸内酯-6-磷酸的方法,包括在腺苷-5'-二磷酸 (ADP) 和腺苷-5'-三磷酸的存在下使己糖激酶、磷酸己糖异构酶和 6-磷酸果糖激酶起作用以将葡萄糖转化为果糖-1,6-二磷酸的方法,和包括在核苷二磷酸 (NDP) 或核苷三磷酸 (NTP) 的存在下使葡萄糖异构酶、果糖激酶和 6-磷酸果糖激酶起作用,以将葡萄糖转化为果糖-1,6-二磷酸的方法。

[0062] 最重要的是,更优选使用己糖激酶或葡萄糖激酶将葡萄糖磷酸化的方法。例如,特别优选在镁离子、ATP、磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 和丙酮酸激酶 (PK) 的存在下,通过使用己糖激酶或葡萄糖激酶的酶促环化方法,将葡萄糖磷酸化的方法。

[0063] 用于上述转化的酶没有特别限制,只要它们不需要 1,5-脱水葡萄糖醇作为底物即可,其例子包括根据 IUPAC-IUB 命名法,归类为葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)、葡萄糖脱氢酶 (EC 1.1.1.47、EC1.1.1.118、EC1.1.1.119 和 EC1.1.99.10)、己糖激酶 (EC2.7.1.1)、葡萄糖激酶 (EC2.7.1.2)、作为磷酸己糖异构酶的葡萄糖-6-磷酸酮醇异构酶 (EC5.3.1.9)、葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.18)、果糖激酶 (EC2.7.1.4) 和作为 6-磷酸果糖激酶的磷酸己糖激酶 (EC2.7.1.11) 的酶。也可以使用市售品。使用 NDP 依赖性己糖激酶,特别是例如 ADP 依赖性己糖激酶作为己糖激酶没有问题。

[0064] 另外,在包括用葡萄糖氧化酶和葡萄糖脱氢酶氧化葡萄糖的方法中,也可以使用葡糖酸内酯酶 (EC3.1.1.17),将产生的葡糖酸-1,5-内酯完全转化为葡糖酸,如果必要,可以组合使用变旋酶 (EC5.1.3.3)。

[0065] 在本发明的测定方法中,将葡萄糖和 1,5-脱水葡萄糖醇两者磷酸化的己糖激酶或葡萄糖激酶也可以用于包括将 1,5-脱水葡萄糖醇转化成 1,5-脱水葡萄糖醇-6-磷酸并使用对 1,5-脱水葡萄糖醇-6-磷酸起作用的酶测定的方法中。

[0066] 通过例如使转化试剂和全血彼此接触,进行将葡萄糖和 / 或其衍生物转化成不干

扰本发明测定的物质。具体地,这些物质可以预先在容器中混合,或者可以将转化试剂装载到后面所述的传感器芯片上。转化试剂的例子包括由己糖激酶(HK)和/或葡萄糖激酶(GK)、丙酮酸激酶(PK)、腺苷-5'-三磷酸(ATP)、磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、氯化镁或硫酸镁和氯化钾组成的溶液和溶液的干燥试剂。

[0067] 己糖激酶优选衍生自酵母,葡萄糖激酶优选衍生自嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)。所述转化试剂可以包含己糖激酶和葡萄糖激酶两者或其中任何一种。己糖激酶和/或葡萄糖激酶在转化试剂溶液中的浓度为1-500U/mL,优选为20-300U/mL。

[0068] 丙酮酸激酶在转化试剂溶液中的浓度为1-500U/mL,优选为20-300U/mL。ATP的浓度为1-200mM,优选为10-80mM。磷酸烯醇丙酮酸的浓度为10-1500mM,优选为100-500mM。氯化镁或硫酸镁的浓度为1-200mM,优选为5-50mM。氯化钾的浓度为1-200mM,优选为5-50mM。

[0069] 另外,向转化试剂中添加对各干扰物质起作用的酶如抗坏血酸氧化酶、尿酸氧化酶或胆红素氧化酶有效防止除葡萄糖以外的其它干扰物质干扰测定。例如,抗坏血酸氧化酶在转化试剂溶液中的浓度为1-1000U/mL,优选为5-500U/mL。

[0070] 下面将解释使用酶电化学测定全血中的1,5-脱水葡萄糖醇的步骤。测定方法的例子包括:包括用酶直接测定由氧化还原反应产生的过氧化氢的方法和使用作为参与氧化还原反应的电子传递媒介的氧化还原介体的方法。

[0071] 酶的例子包括氧化1,5-脱水葡萄糖醇的酶,更优选氧化还原酶。其例子包括根据IUPAC-IUB命名法,归类为吡喃糖氧化酶(EC 1.1.3.10)、L-山梨糖氧化酶(EC 1.1.3.11)、L-山梨糖脱氢酶(EC1.1.99.12)、1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶(EC1.1.99.13)的酶。

[0072] 氧化还原酶的例子包括:专利文献12所述由担子菌类真菌(*Basidiomycetous fungi*)No.52(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号FERM P-10106)产生的吡喃糖氧化酶,专利文献7所述的钝头多孔菌(*Polyporus obtusus*)ATCC26733等,专利文献13所述由血红色陀螺孔菌(*Trametes sanguinea*)IF04923产生的L-山梨糖氧化酶、由氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)UV-10(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号FERM P-8422)产生的L-山梨糖脱氢酶等,专利文献11所述由假单孢菌 sp. NK-85001(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号BP-1037)产生的1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶等,专利文献14所述由真菌如皮壳正青霉(*Eupenicillium crustaceum*)IF0-8938产生的1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶等,专利文献15所述由长枝木霉菌(*Trichoderma longibrachiatum*)KDK3003(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号FERM BP-6458)产生的1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶等,专利文献16所述由水生拉恩杆菌(*Rahnella aquatilis*)474(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号FERM P-16158)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)340(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号FERM P-16157)和粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*)825(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号FERM P-16159)产生的1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶等,可以无需要电子受体而使1,5-脱水葡萄糖醇脱氢的专利文献6所述由土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)NT1130菌株(国际专利生物保藏机构,日本产业技术综合研究所:保藏编号FERM BP-5997)产生的1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶,专利文献10所述由海黄嗜纤维菌

(Cytophagamarinoflava) ATCC19326 产生的 D- 葡糖苷-3- 脱氢酶等, 以及专利文献 17、18 和 12 所述的酶。另外, 也可以使用氧化 1,5- 脱水葡萄糖醇的其它市售氧化还原酶。

[0073] 其中, 更优选吡喃糖氧化酶、L- 山梨糖氧化酶和 1,5- 脱水葡萄糖醇脱氢酶。

[0074] 另外, 在通过普通基因操纵技术识别并改进或修饰这些酶的基因后, 则使用重组大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) 等产生的酶也可以用于本发明的测定方法, 只要它们是需要 1,5- 脱水葡萄糖醇作为底物的氧化还原酶即可。

[0075] 电化学测定方法的例子包括电流分析法 (包括测定电流的方法)、电量分析法 (包括测定电量的方法)、电位扫描法和循环伏安法。其中, 更优选电流分析法和电量分析法。

[0076] 可以使用金、铂、碳、钯、银或银-氯化银, 在绝缘板上形成用于电化学测定方法的电极。绝缘板材料的例子包括塑料如聚对苯二甲酸乙二酯、聚碳酸酯和聚碳酸乙烯酯以及玻璃, 更优选聚对苯二甲酸乙二酯。可以通过丝网印刷、真空沉积、溅射等在该板上形成电极。在这些方法中, 更优选丝网印刷。具体地, 优选的是, 通过将导电碳墨或银-氯化银丝网印刷到由聚对苯二甲酸乙二酯制成的板上, 并在 100-150°C 淬火所述板, 从而形成电极。

[0077] 作为用于本发明的电化学测定 1,5- 脱水葡萄糖醇的电极, 可以使用形成工作电极、对电极和参比电极的三电极或者形成工作电极和对电极的双电极。通常, 在使用三电极测定时, 将电位施加到工作电极上, 使用参比电极作为参照, 并测定在工作电极和对电极之间流动的电流。在使用双电极测定时, 使用对电极作为参比电极, 将预定的电位施加到工作电极上, 使用对电极作为参照, 并测定在工作电极和对电极之间流动的电流。

[0078] 各种方法均可用于电化学测定, 本发明的例子包括: 包括使用过氧化氢电极直接测定所产生的过氧化氢的测定方法和使用作为参与氧化还原反应的电子传递媒介的氧化还原介体的测定方法。

[0079] 氧化还原介体的例子包括氧化介体和还原介体, 更优选氧化介体。其中, 更优选钼络合物、醌化合物、二茂铁化合物、吩噻嗪化合物、吩噻啉化合物、吩嗪化合物、靛酚化合物、二苯胺化合物、酚化合物等。钼络合物的例子包括 $[Os(III)(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})Cl]Cl_2$ 及其聚合物。醌化合物的例子包括苯醌、2- 甲基苯醌、2,6- 二甲基苯醌、2,6- 二氯苯醌、2,5- 二羟基苯醌、2- 羟基-1,4- 萘醌、2- 甲基-1,4- 萘醌、2,3- 二甲氧基-5- 甲基-1,4- 苯醌、吡咯并喹啉醌 (PQQ) 和泛醌。二茂铁化合物的例子包括二茂铁基 PEG、二茂铁基 TMA、N, N- 二甲氨基甲基二茂铁和二茂铁甲醇。吩噻啉化合物的例子包括硫堇、亚甲蓝、亚甲基绿、10-(羧甲基氨基羰基)-3,7' - 双 (二甲氨基)- 吩噻啉钠盐、甲苯胺蓝 O、天青 I、天青 Z、天青 A、新亚甲蓝和苯甲酰基无色亚甲蓝。吩噻啉化合物的例子包括麦尔多拉蓝。吩嗪化合物的例子包括吩嗪硫酸二甲酯、1- 甲氧基吩嗪硫酸二甲酯、番红和酚番红。靛酚化合物的例子包括 2- 二氯苯酚-靛酚 (DCIP)。二苯胺化合物的例子包括 4,4' - 双 (二甲氨基) 二苯胺、N-(羧甲基氨基羰基)-4,4' - 双 (二甲氨基)- 二苯胺钠盐、N- 甲基-N- 苯基-1,4- 苯二胺盐酸盐和 N- 甲基-N-(3- 甲氧基苯基)-1,4- 苯二胺盐酸盐。酚化合物的例子包括对氨基苯酚。

[0080] 此外, 可以用于本发明的介体的例子包括铁菁化合物 (铁氰化钾等)、钌络合物或其聚合物、联吡啶化合物 (甲基紫精等)、三苯基甲烷化合物 (孔雀绿、TPM-PS 等)、苯并噻啉化合物 (2- 亚胍基-2,3- 二氢-3- 甲基-6- 苯并噻啉、其磺酸盐等)、菁化合物 (靛花青、酞菁、藻青素等)、偶氮化合物 (品红 J-3GL、黄 C-Y9、黑 C-BK4 等)、联吡啶基偶氮化合

物(5-Br-PSAA、5-Br-PAPS、TAMSMB等)、苯胺及其衍生物(DAPS、HALPS、ADPS、ALPS、TOOS、ALOS等)、聚苯胺及其衍生物、酚化合物(对氨基苯酚等)、苯二胺化合物(Baliamine 蓝B、2,3,5,6-四甲基-对苯二胺等)、罗丹明化合物(罗丹明B等)、咕吨化合物(派洛宁Y、派洛宁B、荧光素钠等)、异咯嗪化合物(核黄素、FAD等)、靛化合物(靛蓝三磺酸、靛蓝胭脂红等)、菲咯啉化合物(浴铜灵磺酸钠、红菲绕啉磺酸钠等)、磺酞化合物(甲基百里酚蓝等)、联苯胺化合物(TMBZ、TMBZ·PS、DAB、茴香胺蓝等)、四唑鎓化合物(WST-1、MTT、Nitro-TB、XTT等)、细胞色素C、光色素、铁氧化还原蛋白、EDTA、NAD和NADP。

[0081] 在本发明的1,5-脱水葡萄糖醇的电化学测定中,将由电极负载的化合物如上面提到的酶和氧化还原介体溶于净化水或合适的缓冲溶液中作为电极试剂并涂布到电极上作为电极试剂溶液。

[0082] 电极试剂中所含的上述氧化还原介体的浓度为例如大约0.01 μ M至1M,优选为0.1 μ M至200mM,作为在通过溶于净化水或合适的缓冲溶液中获得的要涂布到电极上的电极试剂溶液中的浓度。上述酶的浓度为例如大约0.1-5000U/mL,优选为1-2000U/mL,作为在通过溶于净化水或合适的缓冲溶液中获得的要涂布到电极上的电极试剂溶液中的浓度。作为缓冲溶液,可以使用普通生化反应所用的缓冲液,其例子包括2-吗啉基乙磺酸(MES)缓冲液、2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸(HEPES)缓冲液、N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液(tris buffer)和磷酸盐缓冲液。pH为3至10,优选为5至9。缓冲溶液的浓度为1mM至1M,优选为5-500mM。

[0083] 所述电极试剂溶液优选包含低分子量化合物如磺基苯甲酸、糖和糖醇,蛋白质如白蛋白,或亲水大分子化合物如羧甲基纤维素、聚乙二醇、聚乙烯醇和聚乙烯基吡咯烷酮作为稳定剂,所述稳定剂提高酶和氧化还原介体的稳定性,导致在长时期内稳定测定1,5-脱水葡萄糖醇和以有利的精确度测定血液中的1,5-脱水葡萄糖醇。磺基苯甲酸的优选例子包括2-磺基苯甲酸和3-磺基苯甲酸。当低分子量化合物如磺基苯甲酸被用作稳定剂时,其浓度为大约0.1-500mM,优选为大约1-100mM,作为在要涂布到电极上的电极试剂溶液中的浓度。当亲水大分子化合物如白蛋白被用作稳定剂时,其浓度为例如大约0.01-20%,优选为大约0.02-10%,作为在要涂布到电极上的电极试剂溶液中的浓度。

[0084] 优选使上面提到的电极负载上面提到的电极试剂。这可以通过已知方法实现。例如,将预定量的上述电极试剂通过点涂、浸渍或旋涂涂布到电极上,并干燥。另外,除了这样的物理吸附之外,可以将上面提到的电极试剂化学结合到电极上。

[0085] 为了负载到电极上,将上面提到的稳定剂添加到上面提到的电极试剂溶液中,然后涂布并干燥,或者层压到负载着酶等的层上。

[0086] 下面将解释差分电极。

[0087] 差分电极是例如这样的电极,它具有负载氧化还原酶和氧化还原介体试剂的工作电极(例如用于测定1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极)、负载氧化还原介体试剂但不含氧化还原酶的工作电极(例如用于测定空白的电极)和对电极,使用负载氧化还原酶和氧化还原介体试剂的工作电极及负载氧化还原介体试剂但不含氧化还原酶的工作电极,同时测定包含涉及氧化还原介体等的干扰物质的样本,并通过减去干扰所产生的信号部分,除去干扰物质的影响,所述差分电极的结构不受限制,只要起到这种作用即可。其例子包括在后面描述的实施例中的差分电极,它具有用于测定1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极、用于测定

空白的工作电极和对电极,所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶和氧化还原介体,所述用于测定空白的工作电极包含氧化还原介体。

[0088] 这种使用差分电极的电化学测定方法被称为差分法,以葡萄糖为目标的测定是已知的。在这种情况下,干扰物质是尿酸和抗坏血酸。基于 5500–33000 $\mu\text{mol/L}$ 葡萄糖,尿酸的血液浓度为 120–770 $\mu\text{mol/L}$,抗坏血酸的血液浓度为 1–210 $\mu\text{mol/L}$ 。这些浓度远远低于葡萄糖的血液浓度。

[0089] 同时,血液中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 6–300 $\mu\text{mol/L}$,这远远低于葡萄糖的浓度。在电化学测定血液中的 1,5-脱水葡萄糖醇时,尿酸和抗坏血酸同样是干扰物质。然而,这些物质的浓度几乎等于或超过 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度。

[0090] 也就是说,当干扰物质的浓度明显低于待测物质的浓度时所用的差分法是已知的,但到目前为止,没有报导当干扰物质的浓度等于或超过待测物质的浓度时所用的差分法。因此,差分法是否有效和即使当存在浓度等于或超过 1,5-脱水葡萄糖醇(待测物质)的浓度的干扰物质(尿酸、抗坏血酸)时是否能够获得正确的测定结果是未知的。

[0091] 本发明用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片由在绝缘板上形成的上述电极、要与测定装置相连的接合部件、连接电极和接合部件的导线部件、另外用于使电极面积保持恒定以使导线部件绝缘的保护体(resist)(绝缘部件)等构成,还包括用于采集血液作为样本的开孔、血液进入其中的空间、流体通道等。这种结构由膜材料如聚乙烯膜或聚酰亚胺膜、粘合剂如熔性粘合剂、缠绕剂(taping agent)如双侧胶带等形成。

[0092] 也可以使用传感器芯片测定 1,5-脱水葡萄糖醇,在传感器芯片中,电极不负载电极试剂,并将样本和试剂预先混合并添加。然而,优选包括这样的电极的传感器芯片,所述电极具有用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极和对电极,所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶和氧化还原介体,更优选包括差分电极的传感器芯片,所述差分电极具有用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极、用于测定空白的工作电极和对电极,所述用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的工作电极包含用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的氧化还原酶和氧化还原介体,所述用于测定空白的工作电极包含氧化还原介体但不含氧化还原酶。如果必要,所述对电极可以负载上面提到的电极试剂。

[0093] 另外,可以使用具有预处理部件的传感器芯片,所述预处理部件包含实施将葡萄糖和/或其衍生物转化成不干扰测定的物质的步骤的试剂。

[0094] 本发明所用的传感器芯片的一个例子的简化图示于图 1 至 3。

[0095] 本发明还包括用于测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的试剂盒,所述试剂盒至少由上面提到的传感器芯片、用于采血的穿刺装置和 1,5-脱水葡萄糖醇的测定装置组成。所述穿刺装置可以类似于血糖水平自测装置上所附的穿刺装置。该试剂盒还可以包括将葡萄糖和/或其衍生物转化成不干扰测定的物质的步骤中所用的试剂。

[0096] 另外,这种用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的试剂盒可以具有用于采集样品的装置、用于预处理的试剂、校正器等。用于采集样品的装置没有特别限制,只要可以采集约几十 μL 或更少的全血即可,并且可以类似于用于测定血细胞比容的毛细管。

[0097] 下面,将参考下列实施例和参考例更具体地解释本发明。然而,这些实施例仅显

示本发明的一方面,并非限制本发明的范围。实施例中使用通过已知方法获得的酶或市售的酶。

[0098] 所有实施例及参考例 9、10 和 11 中所用的电化学检测器是由东方技研株式会社 (Toho Giken) 制造的配有 GPIB RS232C 的 8-CH 多功能恒电位仪 (Multipotentiostat) 型号 PS-08, 参考例 7 和 8 中所用的电化学检测器是由东方技研株式会社制造的配有函数生成器 FG-02 的 8-CH 多功能恒电位仪型号 PS-08。

[0099] 附图中的 1,5AG 指 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0100] 实施例 1

[0101] 1) 葡萄糖转化试剂

[0102] 在 10.0mM MES 缓冲液中,溶解各组分,在使用 1N 氢氧化钠水溶液将 pH 调整到 7.0 后的组成为:17.6mM $MgCl_2$ 、17.6mM KCl、175.7mM 磷酸烯醇丙酮酸 (PEP)、17.6mM ATP、123U/mL 丙酮酸激酶 (PK)、75U/mL 葡萄糖激酶、200U/mL 抗坏血酸氧化酶、100mM 氯化钠、0.1% NaN_3 、0.1mM EDTA 和 0.06% 牛血清白蛋白 (BSA),以制得葡萄糖转化试剂。

[0103] 2) 电极试剂溶液

[0104] 将 23.6mM 日本专利 3713049 号所述的钨 (III) 络合物 ($[Os(III)(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})Cl]Cl_2$)、930U/mL 吡喃糖氧化酶 (衍生自担子菌类真菌 No. 52) 和 50mM 3-磺基苯甲酸按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0105] 3) 传感器芯片

[0106] 将碳墨 (产品名, Carbon Paste TU15ST:朝日化学研究所 (AsahiChemical Research Laboratory Co.,Ltd.)) 以 10 μm 的厚度丝网印刷到由聚对苯二甲酸乙二酯制成的基盘上,并在 150°C 淬火 40 分钟,以形成工作电极和导线部件以及对电极和导线部件。然后,将保护体油墨 (产品名, CR18G-KF:朝日化学研究所) 以 20 μm 的厚度丝网印刷到除了电极部件和与测定装置的结合处以外的部分上,并在 130°C 淬火 15 分钟。由此制备了图 1 所示的电极 11。

[0107] 电极 11 在样本添加位置 1 上涂布 4 μL 上面 2) 获得的电极试剂溶液,并在 50°C 干燥 13 分钟,制备传感器芯片。

[0108] 4) 建立校正曲线

[0109] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将通过将各 20 μL 已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂 (在通过除了血细胞分离步骤之外的后述参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 3.8、7.8、15.8、31.4 和 63.9 $\mu g/mL$) 添加到血浆中获得的 5 份样本与 10 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μL 反应混合物逐滴地涂布到电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后,在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上,并用电化学检测器 (配有 GPIBRS232C 的 8-CH 多功能恒电位仪型号 PS-08:东方技研株式会社) 测定接下来 5 秒后的电流值。由用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的库仑量与用于测定空白的传感器芯片获得的库仑量之间的差值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。

[0110] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇测定步骤

[0111] 将各 20 μL 尿酸水平几乎等于上面 4) 获得的样本的尿酸水平或者测定样本具有低尿酸水平的来自 3 名正常健康受试者的全血与 10 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中

混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后,在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上,并用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。使用上面 4) 建立的校正曲线,获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 3 份全血样本中的量。结果示于表 1。将 4 次测定的平均值用于建立校正曲线的样本,并将 1 次测定的值用于所述样本。

[0112] 参考例 1

[0113] 将来自实施例 15) 中的测定所用的 3 名正常健康受试者的相同全血样本在 3000rpm 离心分离 10 分钟,并且按照下列参数,使用 1,5-脱水葡萄糖醇测定试剂 (Lana 1,5AG Auto Liquid:日本化药株式会社) 和自动分析仪 7150 (日立制作所株式会社 (Hitachi, Ltd.)) 测定上清液 (血浆) 中的 1,5-脱水葡萄糖醇。结果示于表 1。

[0114]	分析方法	2 点法
[0115]	读取点	24-50
[0116]	样本体积	8 μ L
[0117]	Lana 1,5AG Auto Liquid 预处理试剂 (R1)	240 μ L
[0118]	Lana 1,5AG Auto Liquid 发色试剂 (R2)	120 μ L
[0119]	温度	37 $^{\circ}$ C
[0120]	测定波长 (副 / 主)	700/546nm
[0121]	[表 1]	
[0122]		

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度(μ g/mL)	
	参考例 1	实施例 1
全血样本 1	9.8	10.4
全血样本 2	15.6	16.8
全血样本 3	17.2	17.2

[0123] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质并与电极试剂反应时,1,5-脱水葡萄糖醇在全血样本中的测得值 (实施例 1) 与通过参考例 1 的已知测定方法获得的值非常一致 (相关系数, 0.9881), 表明可以通过本发明测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0124] 实施例 2

[0125] 1) 葡萄糖转化试剂

[0126] 在 10.0mM MES 缓冲液中,溶解各组分,在使用 1N 氢氧化钠水溶液将 pH 调整到 7.0 后的组成为:17.6mM MgCl₂、17.6mM KCl、175.7mM 磷酸烯醇丙酮酸 (PEP)、17.6mM ATP、123U/mL 丙酮酸激酶 (PK)、97U/mL 己糖激酶和 20U/mL 抗坏血酸氧化酶溶解,以制得葡萄糖转化试剂。

[0127] 2) 电极试剂溶液

[0128] (i) 用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇

[0129] 将 23.6mM 钼 (III) 络合物 ([Os(III)(联吡啶基)₂(咪唑基)Cl]Cl₂) 和 465.2U/

mL 吡喃糖氧化酶（衍生自担子菌类真菌 No. 52）按该组成溶于净化水中，制备电极试剂溶液。

[0130] (ii) 用于测定空白

[0131] 将 23.6mM 钼(III)络合物 ($[Os(III)(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})Cl]Cl_2$) 按该组成溶于净化水中，制备电极试剂溶液。

[0132] 3) 传感器芯片

[0133] 制备按照与实施例 1 的 3) 相同的方式制得的两个电极 11，将各 4 μ L 上面 2) 中用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇或空白的电极试剂溶液涂布到各电极的样本添加位置 1 上，并在 50°C 干燥 13 分钟，制备用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和空白的传感器芯片。

[0134] 4) 建立校正曲线

[0135] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线，将各 20 μ L 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂（在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 9.4、18.8、37.5、75.0 和 150.0 μ g/mL）添加到血浆中获得的 5 份样本与 10 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后，将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和空白的各电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后，在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上，并用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。由用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值与用于测定空白的传感器芯片获得的电流值之间的差值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。

[0136] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇的测定

[0137] 将各 20 μ L 用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的来自 6 名正常健康受试者的全血与 10 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后，将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和空白的各电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后，在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上，并用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。将用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值与用于测定空白的传感器芯片获得的电流值之间的差值与校正曲线相比，获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 6 份全血样本中的量。结果示于表 2。将 4 次测定的平均值用于建立校正曲线的样本，并将 1 次测定的值用于所述样本。

[0138] 参考例 2

[0139] 通过与参考例 1 相同的方式，测定与实施例 2 的 5) 中所测相同的全血样本中的 1,5-脱水葡萄糖醇。结果示于表 2。

[0140] [表 2]

[0141]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	参考例 2	实施例 2
全血样本 4	16.4	16.7
全血样本 5	17.5	14.2
全血样本 6	26.2	23.5
全血样本 7	31.5	26.9
全血样本 8	27.2	24.4
全血样本 9	31.4	36.7

[0142] 当使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质,并不分离血细胞而使全血与电极试剂反应时,通过差分法获得的 1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的测得值与通过参考例 2 的测定获得的值非常相关(相关系数,0.8943),表明可以通过本发明测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0143] 实施例 3

[0144] 1) 葡萄糖转化试剂

[0145] 使用实施例 1 的 1) 获得的葡萄糖转化试剂。

[0146] 2) 电极试剂溶液

[0147] (i) 用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇

[0148] 将 23.6mM 钼(III)络合物($[\text{Os}(\text{III})(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})\text{Cl}]\text{Cl}_2$)、930U/mL 吡喃糖氧化酶(衍生自担子菌类真菌 No. 52)和 50mM 3-磺基苯甲酸按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0149] (ii) 用于测定空白

[0150] 将 23.6mM 钼(III)络合物($[\text{Os}(\text{III})(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})\text{Cl}]\text{Cl}_2$)和 50mM 3-磺基苯甲酸按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0151] 3) 传感器芯片

[0152] 通过与上面实施例 2 的 3) 相同的方式,制备用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片和用于测定空白的传感器芯片。

[0153] 4) 建立校正曲线

[0154] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将各 20 μL 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂(在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本的 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 9.5、19.6、39.6、78.5 和 159.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)添加到血浆中获得的 5 份样本与 10 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μL 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和用于测定空白的各电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后,在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上,并用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。由用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值与用于测定空白的传感器芯片获得的电流值之间的差值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。

[0155] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇的测定

[0156] 将各 20 μ L 用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的来自 6 名正常健康受试者的全血与 10 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合,并使混合物静置 5 分钟。然后,将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和用于测定空白的电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后,在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上,并用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。将用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值与用于测定空白的传感器芯片获得的电流值之间的差值与校正曲线相比,获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 6 份全血样本中的量。结果示于表 3。将 4 次测定的平均值用于建立校正曲线的样本,并将 1 次测定的值用于所述样本。

[0157] 参考例 3

[0158] 通过与参考例 1 相同的方式,测定与实施例 3 的 5) 所测相同的全血样本中的 1,5-脱水葡萄糖醇。结果示于表 3。

[0159] [表 3]

[0160]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度(μ g/mL)	
	参考例 3	实施例 3
全血样本 10	9.8	9.7
全血样本 11	15.6	15.5
全血样本 12	17.2	17.3
全血样本 13	24.6	25.1
全血样本 14	30.1	32.8
全血样本 15	29.0	30.8

[0161] 当使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质,并不分离血细胞而使全血与电极试剂反应时,通过差分法(实施例 3)测得的 1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的值与通过参考例 3 的已知测定方法测得的值非常相关(相关系数,0.9982),表明可以通过本发明测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。另外,结果清楚地显示比上面实施例 2(相关系数,0.8943)更好的相关性。也就是说,已经证实通过组合使用稳定剂和差分法,以较好的精确度测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0162] 实施例 4

[0163] 1) 葡萄糖转化试剂

[0164] 使用实施例 1 的 1) 的葡萄糖转化试剂。

[0165] 2) 电极试剂溶液

[0166] (i) 用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇

[0167] 将 11.8mM 钽(III)络合物($[Os(III)(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})Cl]Cl_2$)和 111.0U/mL 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶(衍生自假单胞菌 sp. NK-85001)按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0168] (ii) 用于测定空白

[0169] 为了制备电极试剂溶液,将组分溶于净化水中,使得组成应该为 11.8mM 钼(III)络合物 ($[Os(III)(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})Cl]Cl_2$)。

[0170] 3) 传感器芯片

[0171] 制备按照与实施例 1 的 3) 相同的方式制得的两个电极 11,将各 4 μ L 上面 2) 获得的用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和用于测定空白的电极试剂溶液涂布到各电极的样本添加位置 1 上,并在 50°C 干燥 8 分钟,制备用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和用于测定空白的传感器芯片。

[0172] 4) 建立校正曲线

[0173] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将各 20 μ L 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂(在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 24.2、49.3 和 98.8 μ g/mL) 添加到血浆中获得的 3 份样本与 10 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和用于测定空白的各电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后,在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上,并用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。由用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值与用于测定空白的传感器芯片获得的电流值之间的差值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。

[0174] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇的测定步骤

[0175] 将各 20 μ L 用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的来自 4 名正常健康受试者的全血与 10 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇和用于测定空白的各电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后,在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上,并用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。将用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值和用于测定空白的传感器芯片获得的电流值之间的差值与校正曲线相比,获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 4 份全血样本中的量。结果示于表 4。将 4 次测定的平均值用于建立校正曲线的样本,并将 1 次测定的值用于所述样本。

[0176] 参考例 4

[0177] 通过参考例 1 的步骤,测定与实施例 4 所测相同的全血样本中的 1,5-脱水葡萄糖醇。结果示于表 4。

[0178] [表 4]

[0179]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度($\mu\text{g/mL}$)	
	参考例 4	实施例 4
全血样本 16	9.4	10.0
全血样本 17	14.0	13.8
全血样本 18	27.8	26.2
全血样本 19	32.7	32.6

[0180] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质并与包含 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶的电极试剂反应时,通过差分法(实施例 4)测得的 1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的值与参考例 4 测定的值非常相关(相关系数, 0.9974),表明可以通过本发明测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0181] 参考例 5

[0182] 1) 葡萄糖转化试剂

[0183] 将各组分添加到 10.0mM MES 缓冲液中,在使用 1N 氢氧化钠水溶液将 pH 调整到 7.0 后的组成为:17.6mM MgCl_2 、17.6mM KCl 、175.7mM 磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、17.6mM ATP、123U/mL 丙酮酸激酶(PK)和 97U/mL 己糖激酶,以制得葡萄糖转化试剂。

[0184] 2) 电极试剂溶液

[0185] 为了制备具有两种组成的电极试剂溶液,将 11.8mM 钼(III)络合物($[\text{Os}(\text{III})(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})\text{Cl}]\text{Cl}_2$)、930U/mL 吡喃糖氧化酶(衍生自担子菌类真菌 No. 52)和 50mM 2-磺基苯甲酸(参考例 5-1)或 50mM 3-磺基苯甲酸(参考例 5-2)按该组成溶于净化水中。指定未添加磺基苯甲酸的电极试剂溶液制备为参考例 5-3。

[0186] 3) 传感器芯片

[0187] 通过与上面实施例 1 的 3) 相同的方式制备用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片。

[0188] 4) 测定步骤

[0189] 在第 0 天(就在制备后)和在室温和大约 20% 的湿度下贮存 5 天后使用上面 3) 制备的传感器芯片,将各 20 μL 包含 0 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 1,5-脱水葡萄糖醇的样品与 10 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μL 反应混合物逐滴地涂布到各电极 11 的样本添加位置 1 上。80 秒后,在 10 秒内相对于对电极将 0.15V 施加到工作电极上,用电化学检测器测定接下来 5 秒后的电流值。4 次测定的平均值和标准偏差及变化率示于表 5-1 和 5-2。

[0190] [表 5-1]

[0191]

	1,5-脱水葡萄糖醇 0 $\mu\text{g/mL}$				
	第 1 天		第 5 天		变化率
	平均	标准偏差	平均	标准偏差	第 5 天/第 1 天
	(μA)		(μA)		
参考例 5-1	0.77	0.06	0.96	0.03	1.24
参考例 5-2	0.74	0.02	1.04	0.04	1.41
参考例 5-3	1.35	0.06	3.58	0.18	2.66

[0192] [表 5-2]

[0193]

	1,5-脱水葡萄糖醇 50 $\mu\text{g/mL}$				
	第 1 天		第 5 天		变化率
	平均	标准偏差	平均	标准偏差	第 5 天/第 1 天
	(μA)		(μA)		
参考例 5-1	1.99	0.06	2.16	0.08	1.08
参考例 5-2	1.89	0.02	2.21	0.04	1.17
参考例 5-3	2.68	0.13	4.73	0.22	1.76

[0194] 在参考例 5-1 和 5-2 中,变化率(第 5 天的平均电流值 / 第 1 天的平均电流值)低于参考例 5-3,显示电流值随时间的上升受到了抑制。另外,标准偏差小,表明测定的可靠性,也就是说测定的精确度得到了改善。这些结果证实了将稳定剂添加到电极试剂中的效果,所述稳定剂可以用于电化学测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0195] 实施例 5

[0196] 1) 葡萄糖转化试剂

[0197] 使用实施例 1 的 1) 制备的葡萄糖转化试剂。

[0198] 2) 预处理步骤(用于 1,5-脱水葡萄糖醇和空白的普通测定)

[0199] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将各 10 μL 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂(在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 3.8、7.8、15.8 和 31.4 $\mu\text{g/mL}$) 添加到血浆中获得的 4 份样本或 4 份人全血样本与 10 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。

[0200] 3) 电极测定前的步骤

[0201] (i) 1,5-脱水葡萄糖醇测定步骤

[0202] 向经过上述预处理步骤后的溶液中连续添加 5 μL 其中溶解了 22.0mM 2,6-二甲基苯醌的 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 和 5 μL 其中溶解了 200U/mL 吡喃糖氧化酶(衍生自担子菌类真菌 No. 52) 的 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 混合, 并静置 5 分钟。

[0203] (ii) 空白测定步骤

[0204] 向经过上述预处理步骤后的溶液中连续添加 5 μ L 其中溶解了 22.0mM 2,6-二甲苯醌的 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 和 5 μ L 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 混合, 并静置 5 分钟。

[0205] 4) 使用传感器芯片的测定步骤

[0206] 将碳墨 (产品名, Carbon Paste TU15ST:朝日化学研究所) 以 10 μ m 的厚度丝网印刷到由聚对苯二甲酸乙二酯制成的基盘上, 作为工作电极和导线部件、对电极和导线部件以及参比电极和导线部件, 并在 150 $^{\circ}$ C 淬火 40 分钟。然后, 将保护体油墨 (产品名, CR18G-KF:朝日化学研究所) 以 20 μ m 的厚度丝网印刷到除了电极部件与测定装置之间的接合部件以外的部分, 并在 130 $^{\circ}$ C 淬火 15 分钟, 制备图 2 所示的电极 12。

[0207] 将各 15 μ L 上面 3) 获得的反应混合物逐滴地涂布到电极 12 的样本添加位置 1 上, 使用参比电极作为参照, 在 10 秒内施加 0.5V, 在 5 秒后, 用电化学检测器测定用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片和用于测定空白的传感器芯片的电流值。

[0208] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇的量的计算

[0209] 从使用用于建立 1,5-脱水葡萄糖醇校正曲线的样本, 通过上述步骤测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值中减去用于测定空白的传感器芯片获得的电流值, 由所得的电流值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。

[0210] 对于 4 份人全血样本, 从用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的电流值中减去用于测定空白的传感器芯片获得的电流值, 同样将所得的电流值与校正曲线相比, 获得全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇的 量。结果示于表 6。将 4 次测定的平均值用于建立校正曲线的样本和所述样本两者。

[0211] 参考例 6

[0212] 通过与参考例 1 相同的方式, 测定与实施例 5 所测相同的全血样本中的 1,5-脱水葡萄糖醇。结果示于表 6。

[0213] [表 6]

[0214]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度(μ g/mL)	
	参考例 6	实施例 5
全血样本 20	16.7	17.0
全血样本 21	29.8	28.0
全血样本 22	28.9	28.6
全血样本 23	31.7	31.2

[0215] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质并与未负载到电极上的电极试剂反应时, 1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的测得值 (实施例 5) 与通过参考例 6 的已知测定方法测得的值非常一致 (相关系数, 0.9941), 表明可以通过本发明测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0216] 参考例 7

[0217] 根据Denki Kagaku Vol. 63, No. 10, p. 906-913 (1995) 所述用于评价酶和介体的反应速度的方法, 检查上述衍生自担子菌类真菌 No. 52 的吡喃糖氧化酶和表 7 所列的氧化还原介体与 1,5-脱水葡萄糖醇的反应。

[0218] 将碳墨(产品名, Carbon Paste TU15ST;朝日化学研究所)以 10 μm 的厚度丝网印刷到由聚对苯二甲酸乙二酯制成的基盘上, 作为工作电极和导线部件以及对电极和导线部件, 将银-氯化银油墨(产品名, Electrodag PE-409;埃奇森公司(Acheson))以 10 μm 的厚度丝网印刷作为参比电极和导线部件, 并将它们在 150℃ 淬火 40 分钟。然后, 将保护体油墨(产品名, CR18G-KF;朝日化学研究所)以 20 μm 的厚度丝网印刷到除了电极部件与测定装置之间的接合部件以外的部分, 并在 130℃ 淬火 15 分钟, 制备图 3 所示的电极 13。

[0219] 使用电化学检测器(配有函数生成器 FG-02 的 8-CH 多功能恒电位仪型号 PS-08;东方技研株式会社)进行电化学测定。

[0220] 将 10 μL 包含 20U/mL 吡喃糖氧化酶和 60 μM 表 7 所列的氧化还原介体的水溶液放到电极 13 上, 电极 13 在样本添加位置 1 处与电化学检测器相连, 使用电极 13 的参比电极作为参照, 以 1mV/秒从 -0.5V 至 +1V 扫描电位, 并通过循环伏安法测定氧化电流值 I_d 。然后, 将 10 μL 包含 20U/mL 吡喃糖氧化酶、底物(500 μg/mL 1,5-脱水葡萄糖醇)和 60 μM 表 7 所列的氧化还原介体的水溶液放到电极 13 的样本添加位置 1 上, 使用电极 13 的参比电极作为参照, 以 1mV/秒从 -0.5V 至 +1V 扫描电位, 并通过循环伏安法测定催化电流值 I_k 。通过将催化电流值 I_k 除以只存在氧化还原介体时的氧化电流值 I_d 获得的值 I_k/I_d , 比较氧化还原介体与酶的反应速度。

[0221] 各氧化还原介体的 I_k/I_d 结果示于表 7。

[0222] [表 7]

[0223]

氧化还原介体	I_k/I_d
铁氰化钾	1.7
$[Os(III)(\text{联吡啶基})_2(\text{咪唑基})Cl]Cl_2$	14.0
2,6-二甲基对苯醌	6.9
2-甲基-1,4-萘醌	2.3
2,3-二甲氧基-5-甲基-1,4-苯醌	3.3
N,N-二甲氨基甲基二茂铁	5.1
二茂铁甲醇	3.4
硫堇乙酸盐	10.0
亚甲蓝	5.3
甲苯胺蓝 0	4.1
天青 I	16.4
天青 C	5.8
麦尔多拉蓝	1.8
1-甲氧基-5-甲基吩嗪(phenazium)甲基硫酸盐	2.8
2-二氯苯酚-靛酚钠盐二水合物	2.8
4,4'-双(二甲氨基)二苯胺	3.3
N-甲基-N-(3-甲氧基苯基)-1,4-苯二胺盐酸盐	2.6
N-甲基-N-苯基-1,4-苯二胺盐酸盐	2.5
Nitro-TB*	1.9
2,2'-连氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵	1.5
2-亚胍基-2,3-二氢-3-甲基-6-苯并噻唑磺酸	1.2

双 {4-[N-3' - 磺基 - 正丙基 -N- 正丁基] 氨基 -2,6- 二甲基苯基} 甲烷	1.5
双 {4-[N-3' - 磺基 - 正丙基 -N- 乙基] 氨基 -2,6- 二甲基苯基} 甲烷	1.0
对氨基苯酚	3.5
N-(3- 磺丙基) -3,3', 5,5' - 四甲基联苯胺钠盐	1.5

[0224] *Nitro-TB :3,3' -[3,3' -二甲氧基 -(1-1' -联苯) -4,4' -基] -双 [2-(4-硝基苯基) -5- 苯基 -2H- 四唑鎓氯化物]

[0225] 表 7 显示吡喃糖氧化酶与各种氧化还原介体如钼络合物、二茂铁化合物、醌化合物、吩噻嗪化合物、吩噻嗪化合物、吩嗪化合物、二苯胺化合物、靛酚化合物和酚化合物快速反应。这些结果表明,通过使用这些氧化还原介体和吡喃糖氧化酶的方法,例如实施例 1 至 3 的方法,可以电化学测定全血中的 1,5- 脱水葡萄糖醇。

[0226] 参考例 8

[0227] 通过与参考例 7 相同的方式,检查上述 1,5- 脱水葡萄糖醇与表 8 所列的氧化还原介体的反应。

[0228] 通过与参考例 7 相同的方式制备电极 13。

[0229] 将 10 μ L 包含 20U/mL 1,5- 脱水葡萄糖醇脱氢酶 (衍生自假单孢菌 sp. NK-85001) 和 60 μ M 表 8 所列的氧化还原介体的水溶液放到电极 13 上,电极 13 在样本添加位置 1 处与电化学检测器相连,使用电极 13 的参比电极作为参照,以 1mV/ 秒从 -0.5V 至 +1V 扫描电位,并通过循环伏安法测定氧化电流值 I_d 。然后,将 10 μ L 包含 20U/mL 1,5- 脱水葡萄糖醇脱氢酶、底物 (500 μ g/mL 1,5- 脱水葡萄糖醇) 和 60 μ M 表 8 所列的氧化还原介体的水溶液放到电极 13 的样本添加位置 1 上,使用电极 13 的参比电极作为参照,以 1mV/ 秒从 -0.5V 至 +1V 扫描电位,并通过循环伏安法测定催化电流值 I_k 。通过将催化电流值 I_k 除以只含氧化还原介体而不含底物时的氧化电流值 I_d 获得的值 I_k/I_d ,比较氧化还原介体与酶的反应速度。

[0230] 各氧化还原介体获得的 I_k/I_d 结果示于表 8。

[0231] [表 8]

[0232]

氧化还原介体	I_k/I_d
铁氰化钾	3.4
[Os(III)(联吡啶基) ₂ (咪唑基)Cl]Cl ₂	18.0
2,6- 二甲基对苯醌	8.9
2- 甲基 -1,4- 萘醌	64.4
2,3- 二甲氧基 -5- 甲基 -1,4- 苯醌	11.2
N, N- 二甲氨基甲基二茂铁	5.0
二茂铁甲醇	4.9
硫堇乙酸盐	58.8
亚甲蓝	10.9
甲苯胺蓝 0	21.1
天青 I	18.3
天青 C	25.4
新亚甲蓝	4.3
1- 甲氧基 -5- 甲基吩嗪甲基硫酸盐	1.6
2- 二氯苯酚 - 靛酚钠盐二水合物	10.3
4,4' - 双 (二甲氨基) 二苯胺	3.6

N-甲基-N-(3-甲氧基苯基)-1,4-苯二胺盐酸盐	1.4
N-甲基-N-苯基-1,4-苯二胺盐酸盐	2.2
双{4-[N-3'-磺基-正丙基-N-正丁基]氨基-2,6-二甲基苯基}甲烷	1.3
对氨基苯酚	3.2
N-(3-磺丙基)-3,3',5,5'-四甲基联苯胺钠盐	2.2
孔雀绿	2.1

[0233] 表8显示1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶与各种氧化还原介体如钼络合物、二茂铁化合物、醌化合物、吩噻嗪化合物、吩噻啉化合物、吩嗪化合物、二苯胺化合物、靛酚化合物和酚化合物快速反应。这些结果表明,通过使用这些氧化还原介体和1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶的方法,例如实施例4的方法,可以电化学测定全血中的1,5-脱水葡萄糖醇。

[0234] 参考例9

[0235] 1) 葡萄糖转化试剂

[0236] 将各组分添加到50mM MES缓冲液中,在使用1N氢氧化钠水溶液将pH调整到7.0后的组成为:14.8mM MgCl₂、99.2mM KCl、48mM磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、2mM ATP、20U/mL丙酮酸激酶(PK)、16U/mL葡萄糖激酶、10U/mL抗坏血酸氧化酶、200mM氯化钠、0.2mMEDTA. 2Na和1.2g/L BSA,以制得葡萄糖转化试剂。

[0237] 2) 电极试剂溶液

[0238] 为了制备电极试剂溶液(a)、(b)和(c),将下列物质按该组成溶于100mM MES缓冲液(pH 7.0)中:

[0239] (a)0.54mM二茂铁基PEG(同仁化学研究所株式会社(Dojindo Laboratories));

[0240] (b)6.25U/mL辣根过氧化酶(东洋纺织株式会社(Toyobo Co., Ltd.));或者

[0241] (c)50U/mL吡喃糖氧化物酶(衍生自担子菌类真菌No. 52)。

[0242] 3) 传感器芯片

[0243] 首先,将10 μ L 0.5%水性羧甲基纤维素涂布到参考例7制备的电极13的工作电极位置并在50 $^{\circ}$ C干燥10分钟,使电极表面亲水。然后,将3 μ L上面2)获得的电极试剂溶液(a)逐滴地涂布到亲水部件中并干燥,将3 μ L电极试剂溶液(b)逐滴地涂布到其上并干燥,然后再逐滴地涂布3 μ L电极试剂溶液(c)并干燥,制备传感器芯片。

[0244] 4) 建立校正曲线

[0245] 为了建立1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将各20 μ L通过将已知浓度的1,5-脱水葡萄糖醇制剂(在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例1的步骤获得的样本中1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为0、10和50 μ g/mL)添加到生理盐水中获得的3份样本与10 μ L葡萄糖转化试剂在Eppendorf管中混合并静置5分钟。然后,将各15 μ L反应混合物逐滴地涂布到3)的传感器芯片的电极13的样本添加位置1上并反应5分钟,然后使用参比电极(银-氯化银)作为参照,施加0V,并用电化学检测器测定5秒后的电流值。由电流值和1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线,如图4所示。在图中,1,5AG指1,5-脱水葡萄糖醇。

[0246] 获得的校正曲线显示具有有利的浓度依赖性的校正曲线。这些结果表明,通过使用二茂铁基PEG和吡喃糖氧化酶的方法,例如实施例1至3的方法,可以电化学测定全血中的1,5-脱水葡萄糖醇。

[0247] 参考例 10

[0248] 1) 葡萄糖转化试剂

[0249] 使用实施例 1 的 1) 的葡萄糖转化试剂。

[0250] 2) 电极试剂溶液

[0251] 将具有表 9 中的浓度的氧化还原介体和具有表 9 中的浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶 (衍生自假单孢菌 sp. NK-85001) 按各自的组成溶于净化水中, 制备电极试剂溶液。

[0252] 3) 传感器芯片

[0253] 将 2 μ L 上面 2) 获得的电极试剂溶液涂布到参考例 7 制备的电极 13 的工作电极上并在 50°C 干燥 5 分钟, 制备传感器芯片。

[0254] 4) 建立校正曲线

[0255] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线, 将各 10 μ L 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂 (在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 0、2.5、11.9、24.2 和 49.3 μ g/mL) 添加到 0.38% 柠檬酸钠溶液中获得 5 份样本与 5 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后, 将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到电极 13 的样本添加位置 1 上, 使用参比电极 (银-氯化银) 作为参照, 施加表 9 所列的各电位, 用电化学检测器测定 5 秒后的电流值, 并由电流值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。这些校正曲线示于图 5 至 13。

[0256] [表 9]

[0257]

试验 序号	氧化还原介体	电极试剂溶液中的介体浓度 (μ M)	电极试剂溶液中的 AGDH* 浓度 (U/mL)	电 位
1 号	2,6-二甲基对苯醌	150	50	0.5
2 号	2-甲基-1,4-萘醌	150	50	0.1
3 号	硫堇氯化物	75	50	-0.1
4 号	亚甲蓝	200	100	-0.2
5 号	甲苯胺蓝 O	12.5	50	-0.1
6 号	天青 C	75	50	0
7 号	4,4'-双(二甲氨基)二苯胺	75	50	0
8 号	2-二氯苯酚-靛酚 钠盐二水合物	75	50	0.1
9 号	1-甲氧基-5-甲基 吩嗪甲基硫酸盐	150	50	0

[0258] *AGDH: 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶

[0259] 获得的校正曲线均为浓度依赖性的平滑校正曲线。这些结果表明, 通过使用这些介体和 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶的电流分析法, 可以电化学测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0260] 参考例 11

[0261] 1) 葡萄糖转化试剂

[0262] 使用实施例 1 的 1) 中获得的葡萄糖转化试剂。

[0263] 2) 电极试剂溶液

[0264] 将具有表 10 所列浓度的氧化还原介体和具有表 10 所列浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶 (衍生自假单孢菌 sp. NK-85001) 按各自的组成溶于净化水中, 制备电极试剂溶液。

[0265] 3) 传感器芯片

[0266] 将 2 μL 上面 2) 获得的电极试剂溶液涂布到参考例 7 制备的电极 13 的工作电极上并在 50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 5 分钟, 制备传感器芯片。

[0267] 4) 建立校正曲线

[0268] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线, 将各 10 μL 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂 (在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 0、2.5、5.0、11.9、24.2 和 49.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加到 0.38% 柠檬酸钠溶液中获得 6 份样本与 5 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后, 将各 10 μL 反应混合物逐滴地涂布到电极 13 的样本添加位置 1 上, 使用参比电极 (银-氯化银) 作为参照, 在 10 秒内施加表 10 中的各第一电位, 然后使用参比电极 (银-氯化银) 作为参照, 在 110 秒内施加第二电位。使用用于电量分析的电化学检测器, 测定从开始施加第二电位起 100 秒的库仑量, 并由库仑量和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。校正曲线示于图 14 至 27。

[0269]

[表 10]

试验序号	氧化还原介质	电极试剂溶液中的介质浓度(μM)	电极试剂溶液中的 AGDH* 浓度(μM)	第一电位	第二电位
1 号	[Os(III)(联吡啶基) ₂ (咪唑基)Cl]Cl ₂	300	25	0.15	0.25
2 号	2,6-二甲基对苯醌	150	50	0.5	0.6
3 号	2,3-二甲氧基-5-甲基-1,4-苯醌	150	50	0.5	0.6
4 号	2-甲基-1,4-萘醌	150	50	0.1	0.2
5 号	硫羧乙酸盐	5	50	-0.1	0
6 号	硫羧氯化物	75	50	-0.1	0
7 号	亚甲基蓝	200	100	-0.2	-0.1
8 号	甲苯胺蓝 O	12.5	50	-0.1	0
9 号	天青 I	120	40	0.2	0.3
10 号	天青 C	75	50	0	0.1
11 号	麦尔多拉蓝	150	50	0	0.1
12 号	4,4'-双(二甲氨基)二苯胺	75	50	0	0.1
13 号	2-二氯苯酚-靛酚钠盐二水合物	75	50	0.1	0.2
14 号	1-甲氧基-5-甲基吩嗪甲基硫酸盐	150	50	0	0.1

* AGDH: 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶

[0270] 获得的校正曲线均为浓度依赖性的平滑校正曲线。这些结果表明,通过使用这些介质和 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶的电化学分析法,可以电化学测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖

糖醇。

[0271] 实施例 6

[0272] 1) 葡萄糖转化试剂

[0273] 使用实施例 1 的 1) 中获得的葡萄糖转化试剂。

[0274] 2) 电极试剂溶液

[0275] 将 120 μ M 硫堇乙酸盐 (西格玛 - 奥德里奇日本公司 (Sigma-Aldrich Japan K. K.)) 和 40U/mL 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶 (衍生自假单孢菌 sp. NK-85001) 按该组成溶于净化水中, 制备电极试剂溶液。

[0276] 3) 传感器芯片

[0277] 将 2 μ L 上面 2) 获得的电极试剂溶液涂布到参考例 7 制备的电极 13 的工作电极上并在 50°C 干燥 5 分钟, 制备传感器芯片。

[0278] 4) 建立校正曲线

[0279] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线, 将各 10 μ L 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂 (在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 0、2.5、5.0、11.9、24.2、49.3 和 98.8 μ g/mL) 添加到 0.38% 柠檬酸钠溶液中获得 7 份样本与 5 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后, 将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到电极 13 的样本添加位置 1 上, 使用参比电极 (银 - 氯化银) 作为参照, 在 10 秒内施加 -0.1V, 然后在 110 秒内施加 0V。使用电化学检测器测定从开始施加 0V 起 100 秒的库仑量, 并由库仑量和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。显示有利线性的校正曲线示于图 28。

[0280] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇测定步骤

[0281] 将各 10 μ L 来自用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的 7 名受试者的人全血样本和 5 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后, 将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到电极 13 的样本添加位置 1 上, 使用参比电极 (银 - 氯化银) 作为参照, 在 10 秒内施加 -0.1V, 然后在 110 秒内施加 0V。使用电化学检测器测定从开始施加 0V 起 100 秒的库仑量并与校正曲线相比, 获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 7 份全血样本中的量。结果示于表 11。结果是 4 次测定的平均值。

[0282] 参考例 12

[0283] 为了比较, 通过参考例 1 的步骤, 测定与实施例 6 的 5) 所测相同的全血样本中的 1,5-脱水葡萄糖醇。结果示于表 11。

[0284] [表 11]

[0285]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度($\mu\text{g/mL}$)	
	参考例 12	实施例 6
全血样本 24	8.5	10.1
全血样本 25	15.7	15.2
全血样本 26	12.9	12.1
全血样本 27	22.7	19.0
全血样本 28	25.6	24.5
全血样本 29	26.8	21.5
全血样本 30	28.5	26.3

[0286] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质并与包含硫堇乙酸盐的电极试剂反应时,1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的测得值(实施例6)与在参考例12中通过已知测定方法测定的值非常一致(相关系数,0.9771),表明可以通过本发明电化学测定全血中的1,5-脱水葡萄糖醇。

[0287] 实施例7

[0288] 1) 葡萄糖转化试剂

[0289] 使用实施例1的1)中获得的葡萄糖转化试剂。

[0290] 2) 电极试剂溶液

[0291] (i) 用于测定1,5-脱水葡萄糖醇

[0292] 将 $50\mu\text{M}$ 亚甲蓝(米山药品工业株式会社(Yoneyama YakuhinKogyo Co.,Ltd.))和 100U/mL 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶(衍生自假单孢菌 sp. NK-85001)按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0293] (ii) 用于测定空白

[0294] 将 $50\mu\text{M}$ 亚甲蓝(米山药品工业株式会社)按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0295] 3) 传感器芯片

[0296] 将 $2\mu\text{L}$ 上面2)获得的用于测定1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的电极试剂溶液涂布到参考例7制备的图3所示的两个电极13的工作电极上并在 50°C 干燥5分钟,制备用于测定1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的传感器芯片。

[0297] 4) 建立校正曲线

[0298] 为了建立1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将各 $20\mu\text{L}$ 通过将已知浓度的1,5-脱水葡萄糖醇制剂(在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例1的步骤获得的样本中1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 0.6 、 2.8 、 5.0 、 10.0 、 24.7 和 $50.2\mu\text{g/mL}$)添加到已知实际上不含1,5-脱水葡萄糖醇的绵羊血清(日本生物检验实验室株式会社(Nippon Bio Test Lab.))中获得的6份样本与 $10\mu\text{L}$ 葡萄糖转化试剂在Eppendorf管中混合并静置5分钟。然后,将各 $10\mu\text{L}$ 反应混合物逐滴地涂布到用于测定1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的传感

器芯片的电极 13 的样本添加位置 1 上,使用各传感器芯片的参比电极(银-氯化银)作为参照,在 10 秒内施加 -0.2V,然后在 110 秒内施加 -0.1V。使用电化学检测器测定从开始施加 -0.1V 起 100 秒的库仑量。由从用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片的库仑量中减去用于测定空白的传感器芯片的库仑量所获得的库仑量和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。显示有利线性的校正曲线示于图 29。

[0299] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇测定步骤

[0300] 将各 20 μ L 来自实施例 6 的 7 名受试者的全血和 10 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的传感器芯片的电极 13 的样本添加位置 1 上,并使用各传感器芯片的参比电极(银-氯化银)作为参照,在 10 秒内施加 -0.2V,然后在 110 秒内施加 -0.1V。使用电化学检测器(配有 GPIB RS232C 的 8-CH 多功能恒电位仪型号 PS-08:东方技研株式会社)测定从开始施加 -0.1V 起 100 秒的库仑量,并将从用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片的库仑量中减去用于测定空白的传感器芯片的库仑量所获得的库仑量与校正曲线相比,获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 7 份全血样本中的量。结果示于表 12。结果是 4 次测定的平均值。

[0301] 参考例 12

[0302] 由于实施例 7 所用的样本是与实施例 6 相同的全血样本,因此将实施例 6 的结果作为参考例 12 示于表 12 中。

[0303] [表 12]

[0304]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度(μ g/mL)	
	参考例 12	实施例 7
全血样本 24	8.5	9.6
全血样本 25	15.7	14.5
全血样本 26	12.9	12.9
全血样本 27	22.7	23.7
全血样本 28	25.6	20.9
全血样本 29	26.8	23.9
全血样本 30	28.5	24.1

[0305] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质并与包含亚甲蓝的电极试剂反应时,1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的测得值(实施例 7)与在参考例 12 中通过已知测定方法测定的值非常一致(相关系数,0.9658),表明可以通过本发明电化学测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0306] 实施例 8

[0307] 1) 葡萄糖转化试剂

[0308] 使用实施例 1 的 1) 中获得的葡萄糖转化试剂。

[0309] 2) 电极试剂溶液

[0310] 将 120 μM 硫堇乙酸盐 (西格玛-奥德里奇日本公司) 和 40U/mL 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶 (衍生自假单孢菌 sp. NK-85001) 按该组成溶于净化水中, 制备电极试剂溶液。

[0311] 3) 传感器芯片

[0312] 将 2 μL 上面 2) 获得的电极试剂溶液涂布到参考例 7 制备的电极 13 的工作电极上并在 50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 5 分钟, 制备传感器芯片。

[0313] 4) 建立校正曲线

[0314] 为了建立 1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线, 将各 10 μL 通过将已知浓度的 1,5-脱水葡萄糖醇制剂 (在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例 1 的步骤获得的样本中 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为 0.6、2.8、5.0、10.0、24.7、50.2 和 103.9 $\mu\text{g/mL}$) 添加到绵羊血清 (日本生物检验实验室株式会社) 中获得的 7 份样本与 5 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后, 将各 10 μL 反应混合物逐滴地涂布到电极 13 的样本添加位置 1 上, 使用参比电极 (银-氯化银) 作为参照, 施加 -0.1V, 使用电化学检测器测定 5 秒后的电流值, 并由电流值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。显示有利线性的校正曲线示于图 30。

[0315] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇测定步骤

[0316] 将各 10 μL 来自实施例 6 的 7 名受试者的全血和 5 μL 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后, 将各 10 μL 反应混合物逐滴地涂布到电极 13 的样本添加位置 1 上, 使用参比电极 (银-氯化银) 作为参照, 施加 -0.1V, 使用电化学检测器测定 5 秒后的电流值, 并将所得电流值与校正曲线相比, 获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 7 份全血样本中的量。结果示于表 13。结果是 4 次测定的平均值。

[0317] 参考例 12

[0318] 由于实施例 8 所用的样本是与实施例 6 相同的全血样本, 因此将实施例 6 的结果作为参考例 12 示于表 13 中。

[0319] [表 13]

[0320]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度($\mu\text{g/mL}$)	
	参考例 12	实施例 8
全血样本 24	8.5	10.0
全血样本 25	15.7	14.7
全血样本 26	12.9	11.7
全血样本 27	22.7	19.5
全血样本 28	25.6	25.4
全血样本 29	26.8	21.6
全血样本 30	28.5	27.0

[0321] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测

定的物质并与包含巯基乙酸盐的电极试剂反应时,1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的测得值(实施例8)与在参考例12中通过已知测定方法测定的值非常一致(相关系数,0.9700),表明可以通过本发明电化学测定全血中的1,5-脱水葡萄糖醇。

[0322] 实施例9

[0323] 1) 葡萄糖转化试剂

[0324] 使用实施例1的1)中获得的葡萄糖转化试剂。

[0325] 2) 电极试剂溶液

[0326] 将120 μ M 巯基乙酸盐(西格玛-奥德里奇日本公司)和40U/mL 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶(衍生自假单胞菌 sp. NK-85001)按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0327] 3) 传感器芯片

[0328] 将2 μ L 上面2)获得的电极试剂溶液涂布到参考例7制备的电极13的工作电极上,通过与参考例9相同的方式处理,并在50°C干燥5分钟,制备传感器芯片。

[0329] 4) 建立校正曲线

[0330] 为了建立1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将各10 μ L 通过将已知浓度的1,5-脱水葡萄糖醇制剂(在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例1的步骤获得的样本中1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为0、5.0、11.9和24.2 μ g/mL)添加0.38%柠檬酸钠溶液中获得4份样本与5 μ L 葡萄糖转化试剂在Eppendorf管中混合并静置5分钟。然后,将各10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到电极13的样本添加位置1上,使用参比电极(银-氯化银)作为参照,在110秒内施加0V,使用电化学检测器测定从开始施加起100秒的库仑量,并由传感器芯片的库仑量和1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。显示有利线性的校正曲线示于图31。

[0331] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇测定步骤

[0332] 将各10 μ L 来自用于测定1,5-脱水葡萄糖醇的6名受试者的人全血和5 μ L 葡萄糖转化试剂在Eppendorf管中混合并静置5分钟。然后,将各10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到电极13的样本添加位置1上,使用参比电极(银-氯化银)作为参照,在110秒内施加0V,使用电化学检测器测定从开始施加起100秒的库仑量,并将所得库仑量与校正曲线相比,获得1,5-脱水葡萄糖醇在6份全血样本中的量。结果示于表14。结果是4次测定的平均值。

[0333] 参考例13

[0334] 为了比较,通过参考例1的步骤,测定与实施例9的5)所测相同的全血样本中的1,5-脱水葡萄糖醇。结果示于表14。

[0335] [表14]

[0336]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	参考例 13	实施例 9
全血样本 31	8.9	10.6
全血样本 32	16.2	15.2
全血样本 33	14.1	14.0
全血样本 34	23.3	21.3
全血样本 35	25.9	23.1
全血样本 36	32.1	24.7

[0337] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质并与包含巯基乙酸盐的电极试剂反应时,1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的测得值(实施例9)与在参考例13中通过已知测定方法测定的值非常一致(相关系数,0.9855),表明可以通过本发明电化学测定全血中的1,5-脱水葡萄糖醇。

[0338] 实施例10

[0339] 1) 葡萄糖转化试剂

[0340] 使用实施例1的1)中获得的葡萄糖转化试剂。

[0341] 2) 电极试剂溶液

[0342] (i) 用于测定1,5-脱水葡萄糖醇

[0343] 将100 μM 亚甲蓝(东京化成工业株式会社(Tokyo Kasei Kogyo))和50U/mL 1,5-脱水葡萄糖醇脱氢酶(衍生自假单孢菌 sp. NK-85001)按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0344] (ii) 用于测定空白

[0345] 将100 μM 亚甲蓝(东京化成工业株式会社)按该组成溶于净化水中,制备电极试剂溶液。

[0346] 3) 传感器芯片

[0347] 制备参考例7制备和图3所示的两个电极13,将2 μL 上面2)获得的用于测定1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的电极试剂溶液涂布到所述电极的工作电极上并在50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥5分钟,制备用于测定1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的传感器芯片。

[0348] 4) 建立校正曲线

[0349] 为了建立1,5-脱水葡萄糖醇的校正曲线,将各20 μL 通过将已知浓度的1,5-脱水葡萄糖醇制剂(在通过除了血细胞分离步骤之外的参考例1的步骤获得的样本中1,5-脱水葡萄糖醇的浓度为0.6、10.0、50.2和103.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)添加到绵羊血清(Nippon Bio Test Lab.)中获得的4份样本与10 μL 葡萄糖转化试剂在Eppendorf管中混合并静置5分钟。然后,将各10 μL 反应混合物逐滴地涂布到用于测定1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的传感器芯片的电极13的样本添加位置1上,使用传感器芯片的参比电极(银-氯化银)作为参照,在110秒施加-0.1V,并使用电化学检测器测定从开始施加-0.1V起100秒的库仑量。由用于测定1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片获得的库仑量与用于测定空白的

传感器芯片获得的库仑量之间的差值和 1,5-脱水葡萄糖醇的浓度建立校正曲线。具有有利线性的校正曲线示于图 32。

[0350] 5) 1,5-脱水葡萄糖醇测定步骤

[0351] 将各 20 μ L 来自实施例 9 的 6 名受试者的全血和 10 μ L 葡萄糖转化试剂在 Eppendorf 管中混合并静置 5 分钟。然后,将各 10 μ L 反应混合物逐滴地涂布到用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇或用于测定空白的传感器芯片的电极 13 的样本添加位置 1 上,使用传感器芯片的参比电极(银-氯化银)作为参照,在 110 秒内施加 -0.1V,使用电化学检测器测定从开始施加 -0.1V 起 100 秒的库仑量,并将由从用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的传感器芯片的库仑量中减去用于测定空白的传感器芯片的库仑量所获得的库仑量与校正曲线相比,获得 1,5-脱水葡萄糖醇在 6 份全血样本中的量。结果示于表 15。结果是 4 次测定的平均值。

[0352] 参考例 13

[0353] 由于实施例 10 所用的样本是与实施例 9 所用的相同的全血样本,因此将实施例 9 的结果作为参考例 13 示于表 15 中。

[0354] [表 15]

[0355]

	1,5-脱水葡萄糖醇浓度(μ g/mL)	
	参考例 13	实施例 10
全血样本 31	8.9	11.0
全血样本 32	16.2	17.2
全血样本 33	14.1	15.0
全血样本 34	23.3	24.0
全血样本 35	25.9	24.5
全血样本 36	32.1	31.4

[0356] 当不分离血细胞而使葡萄糖转化试剂对全血起作用以将葡萄糖转化成不干扰测定的物质并与包含亚甲蓝的电极试剂反应时,通过差分法测定的 1,5-脱水葡萄糖醇在全血中的测得值(实施例 10)与参考例 13 中通过已知测定方法测定的值非常一致(相关系数,0.9964),表明可以通过本发明电化学测定全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇。

[0357] 工业实用性

[0358] 通过本发明用于测定 1,5-脱水葡萄糖醇的方法,可以测定痕量全血中的 1,5-脱水葡萄糖醇,所述方法电化学测定 1,5-脱水葡萄糖醇而不使用离心机等。因此,本发明的测定方法可以用于在床边或门诊中快速测定 1,5-脱水葡萄糖醇和由患者自己在家中测定。

附图说明

[0359] 图 1 是显示本发明所用电极 11 的简化图;

- [0360] 图 2 是显示本发明所用电极 12 的简化图；
- [0361] 图 3 是显示本发明所用电极 13 的简化图；
- [0362] 图 4 是参考例 9 建立的校正曲线；
- [0363] 图 5 是参考例 10 的表 9 中 1 号试验的校正曲线；
- [0364] 图 6 是参考例 10 的表 9 中 2 号试验的校正曲线；
- [0365] 图 7 是参考例 10 的表 9 中 3 号试验的校正曲线；
- [0366] 图 8 是参考例 10 的表 9 中 4 号试验的校正曲线；
- [0367] 图 9 是参考例 10 的表 9 中 5 号试验的校正曲线；
- [0368] 图 10 是参考例 10 的表 9 中 6 号试验的校正曲线；
- [0369] 图 11 是参考例 10 的表 9 中 7 号试验的校正曲线；
- [0370] 图 12 是参考例 10 的表 9 中 8 号试验的校正曲线；
- [0371] 图 13 是参考例 10 的表 9 中 9 号试验的校正曲线；
- [0372] 图 14 是参考例 10 的表 10 中 1 号试验的校正曲线；
- [0373] 图 15 是参考例 10 的表 10 中 2 号试验的校正曲线；
- [0374] 图 16 是参考例 10 的表 10 中 3 号试验的校正曲线；
- [0375] 图 17 是参考例 10 的表 10 中 4 号试验的校正曲线；
- [0376] 图 18 是参考例 10 的表 10 中 5 号试验的校正曲线；
- [0377] 图 19 是参考例 10 的表 10 中 6 号试验的校正曲线；
- [0378] 图 20 是参考例 10 的表 10 中 7 号试验的校正曲线；
- [0379] 图 21 是参考例 10 的表 10 中 8 号试验的校正曲线；
- [0380] 图 22 是参考例 10 的表 10 中 9 号试验的校正曲线；
- [0381] 图 23 是参考例 10 的表 10 中 10 号试验的校正曲线；
- [0382] 图 24 是参考例 10 的表 10 中 11 号试验的校正曲线；
- [0383] 图 25 是参考例 10 的表 10 中 12 号试验的校正曲线；
- [0384] 图 26 是参考例 10 的表 10 中 13 号试验的校正曲线；
- [0385] 图 27 是参考例 10 的表 10 中 14 号试验的校正曲线；
- [0386] 图 28 是实施例 6 建立的校正曲线；
- [0387] 图 29 是实施例 7 建立的校正曲线；
- [0388] 图 30 是实施例 8 建立的校正曲线；
- [0389] 图 31 是实施例 9 建立的校正曲线；和
- [0390] 图 32 是实施例 10 建立的校正曲线。
- [0391] 附图标记描述
- [0392] 1. 样本添加位置
- [0393] 2. 支撑体
- [0394] 3. 工作电极
- [0395] 4. 对电极
- [0396] 5. 保护体
- [0397] 6. 参比电极（碳墨）
- [0398] 6a. 参比电极（银 - 氯化银油墨）

- [0399] 11. 电极
- [0400] 12. 电极
- [0401] 13. 电极

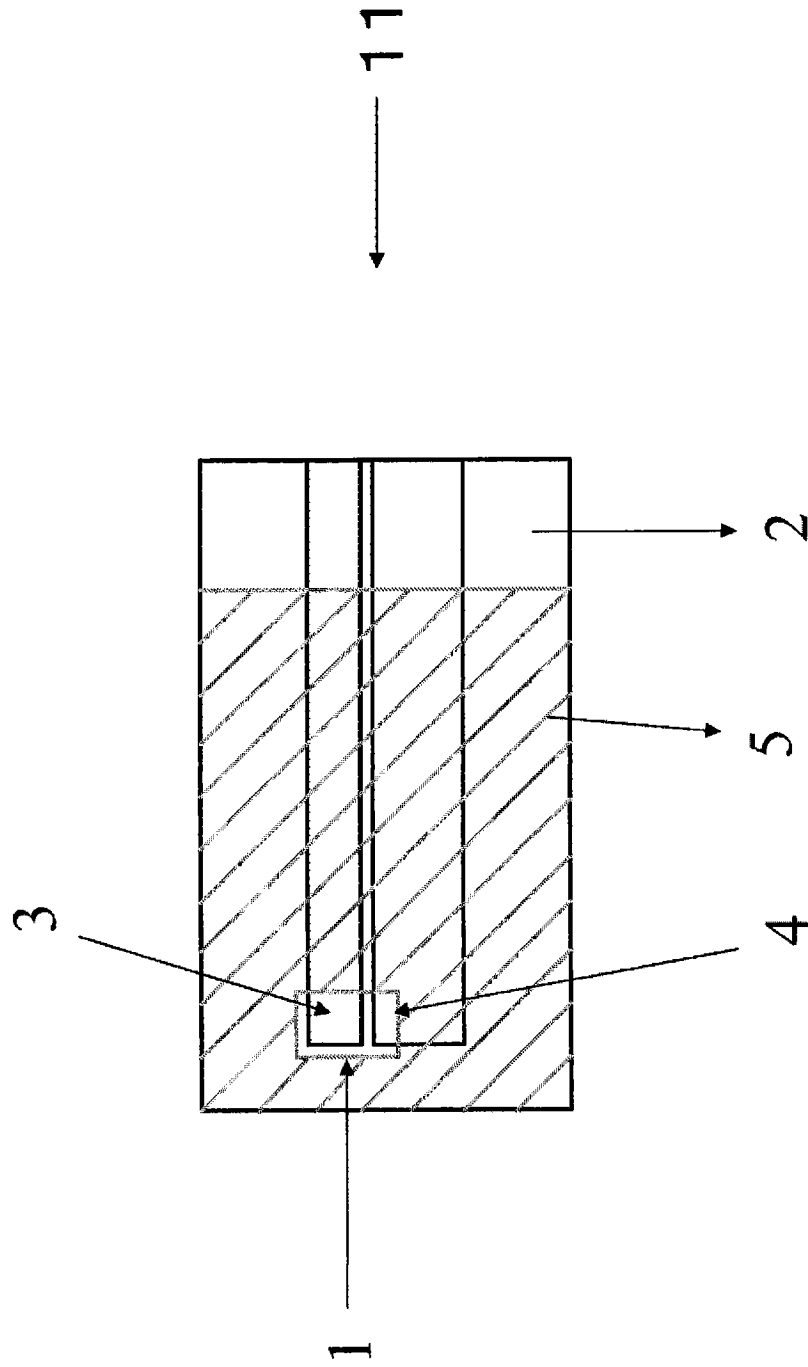


图 1

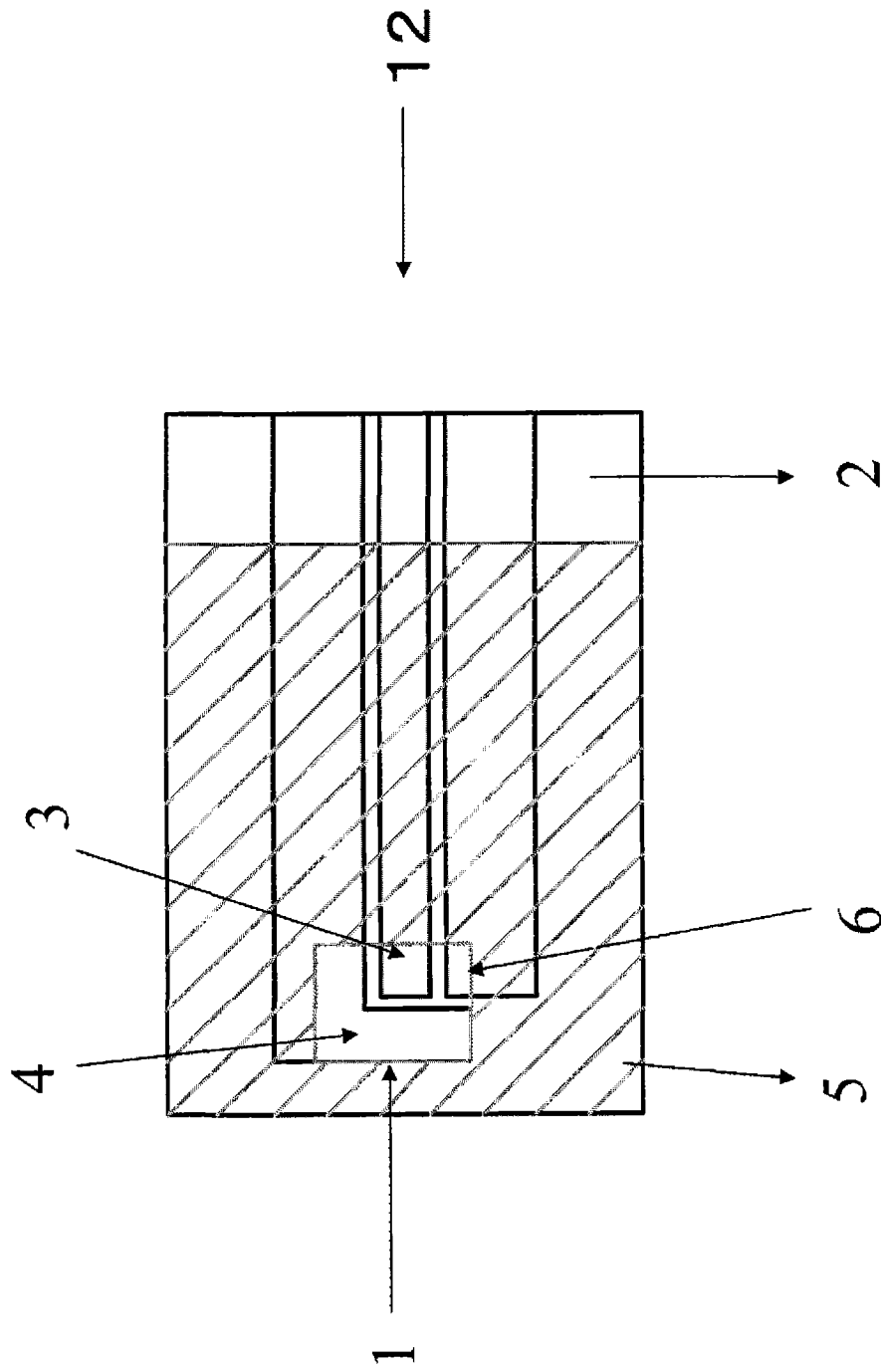


图 2

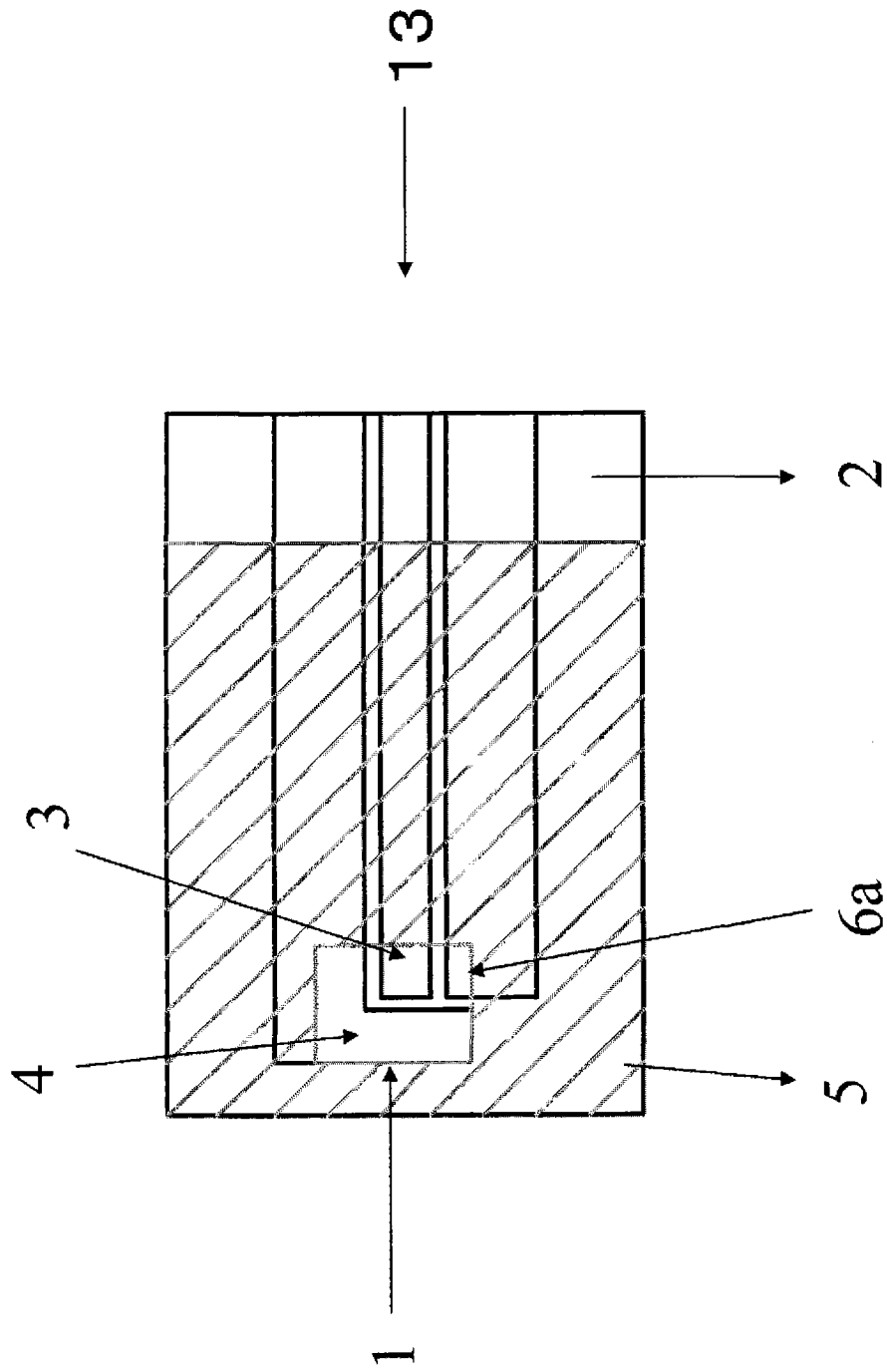


图 3

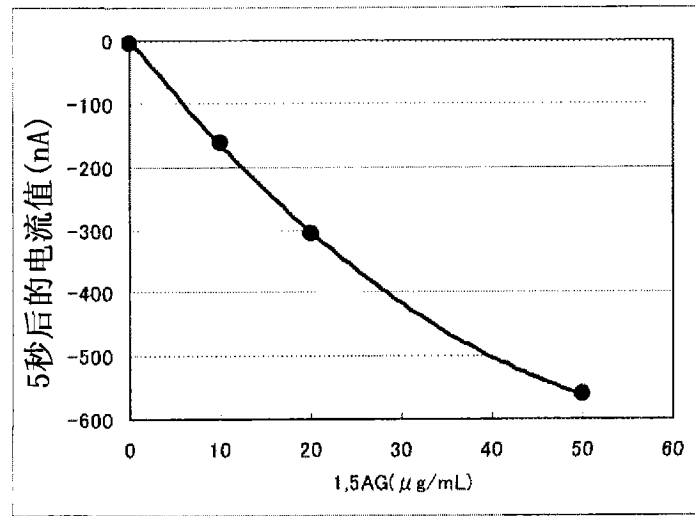


图 4

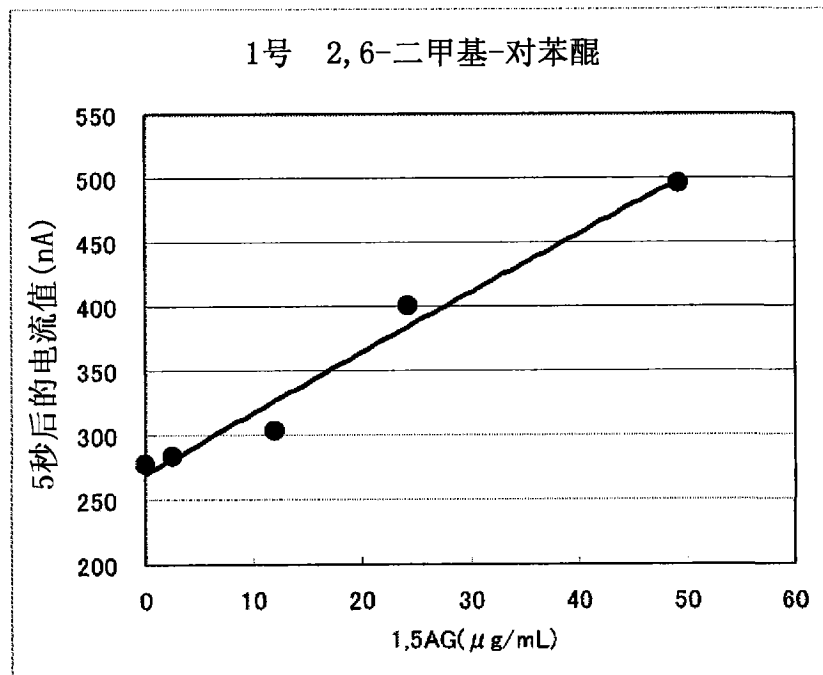


图 5

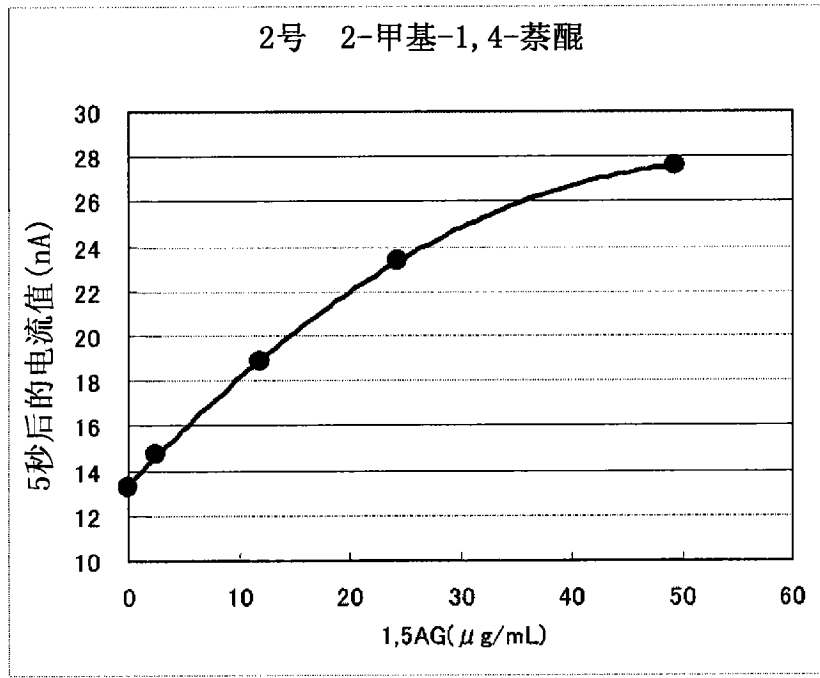


图 6

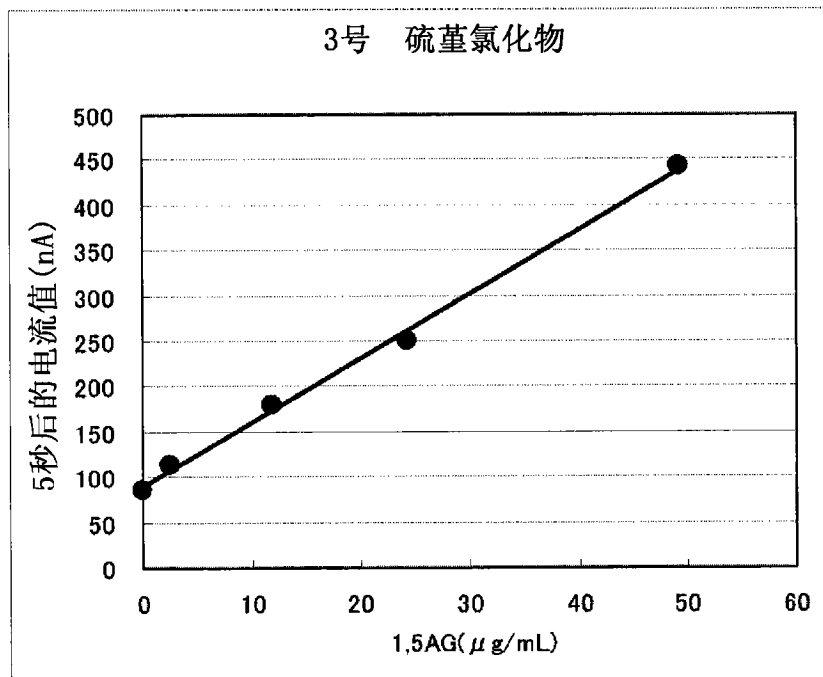


图 7

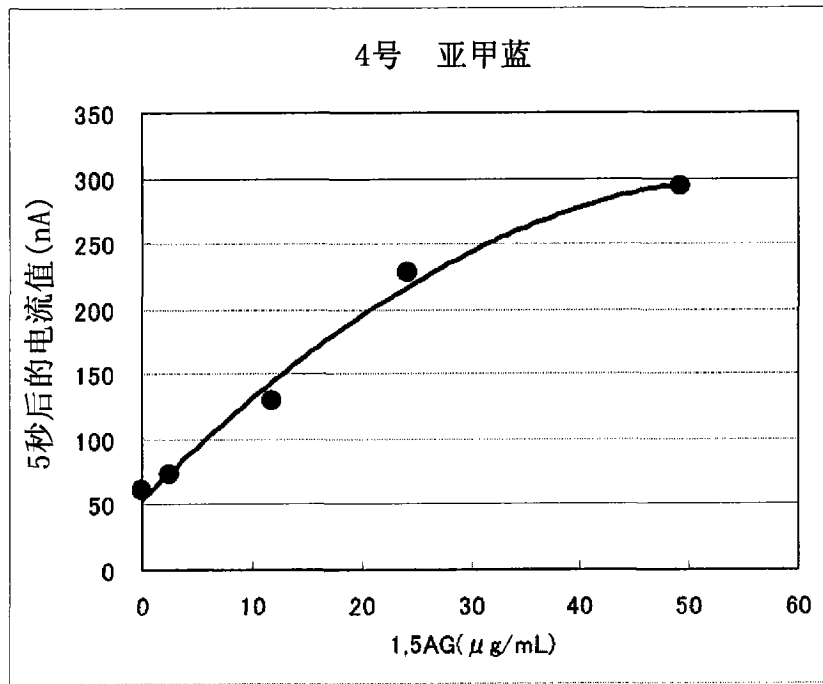


图 8

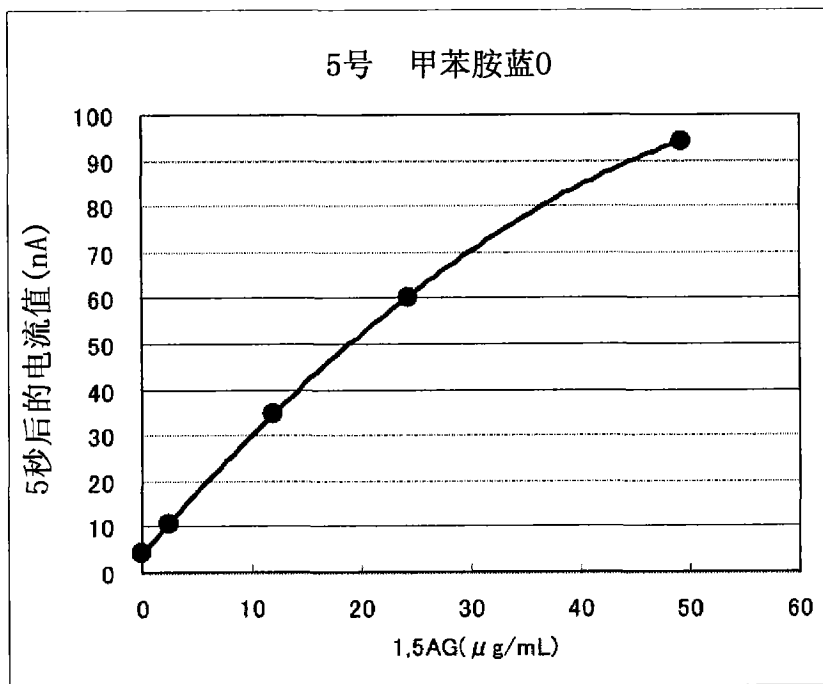


图 9

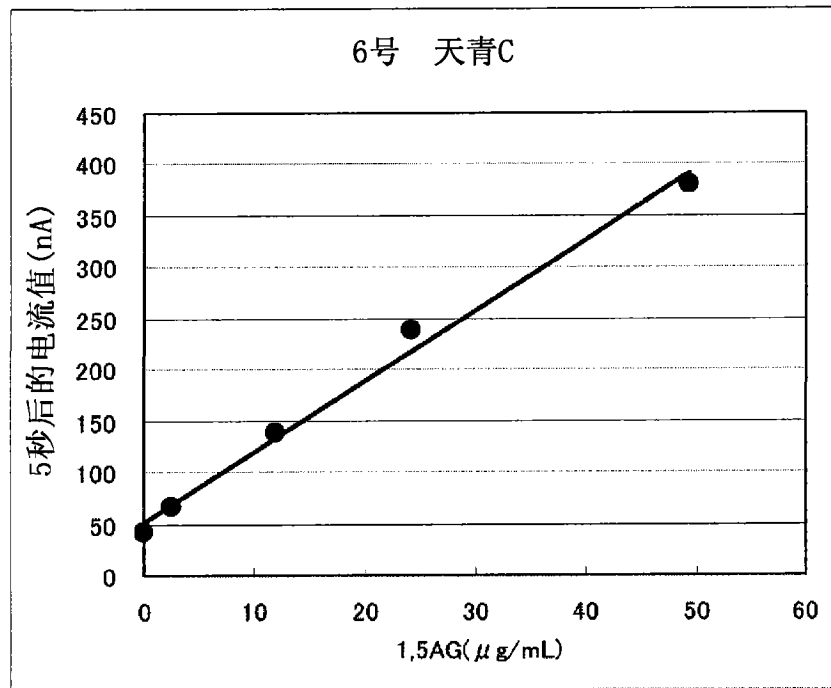


图 10

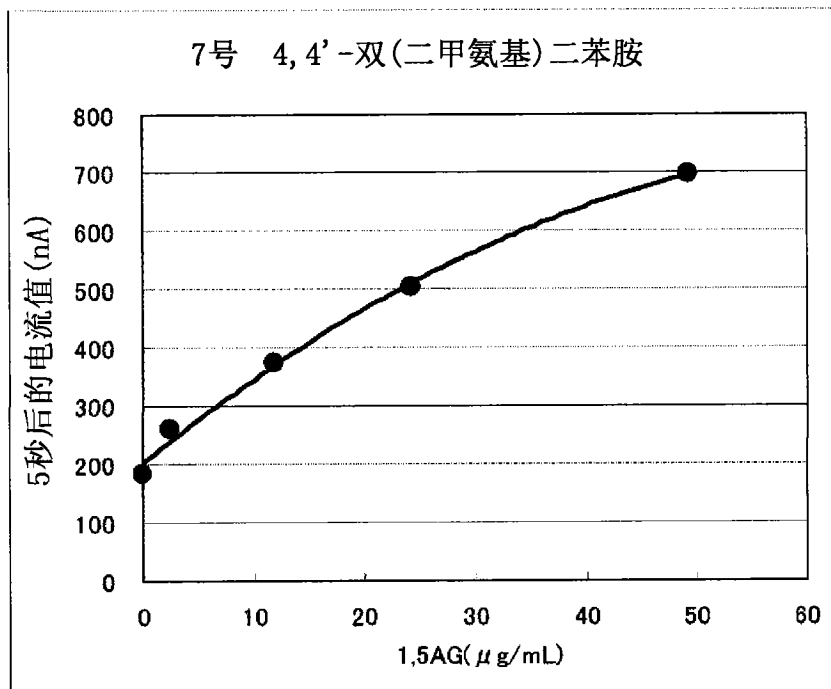


图 11

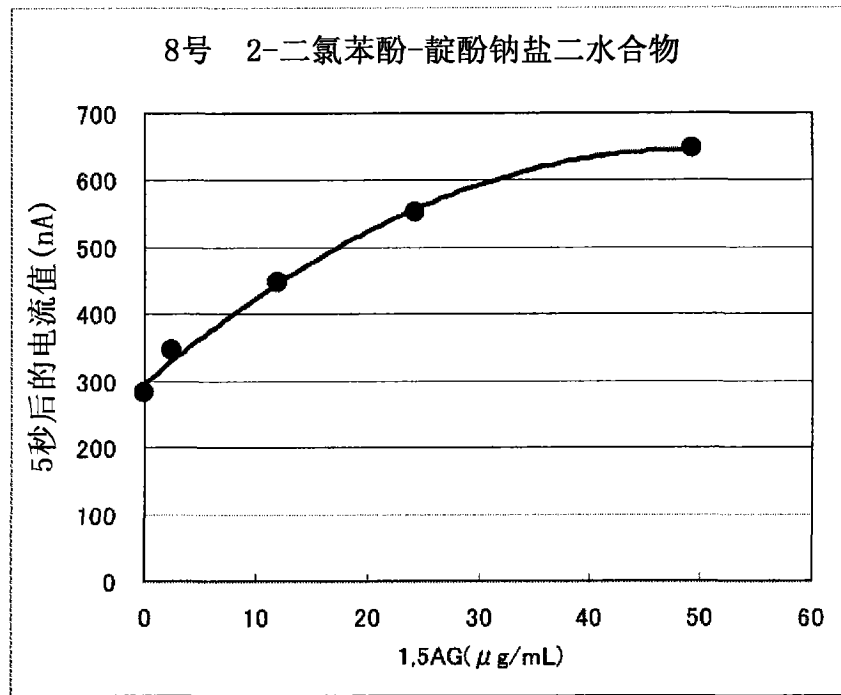


图 12

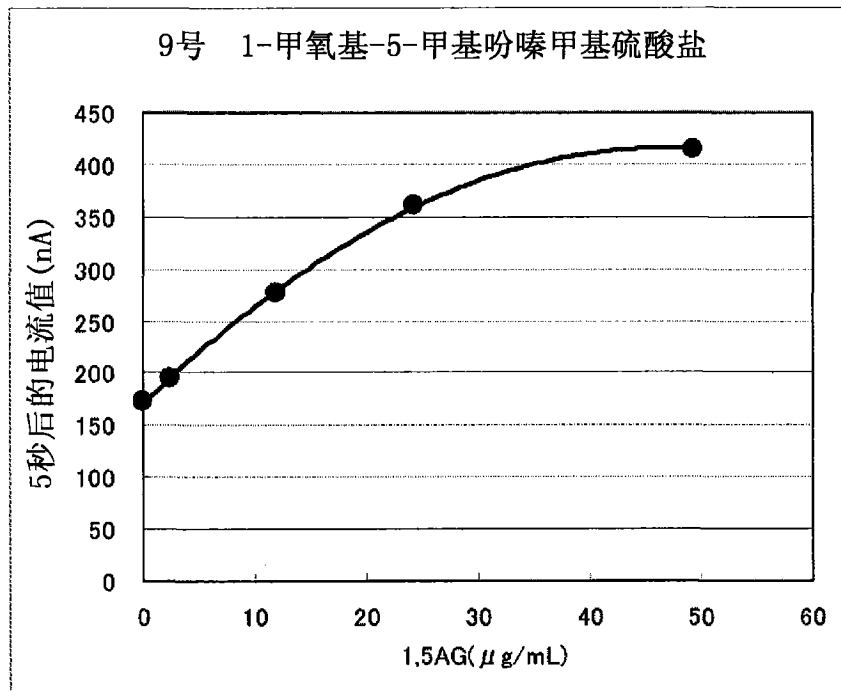


图 13

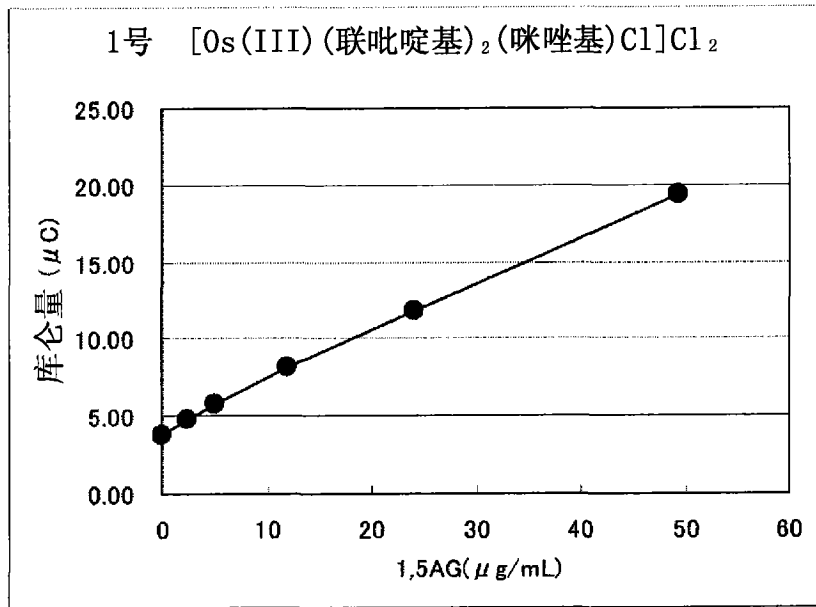


图 14

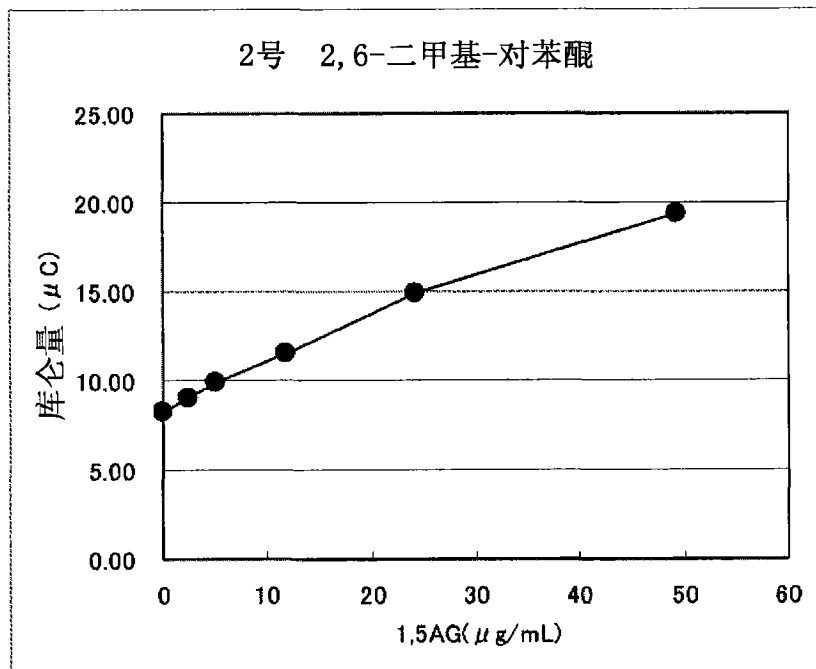


图 15

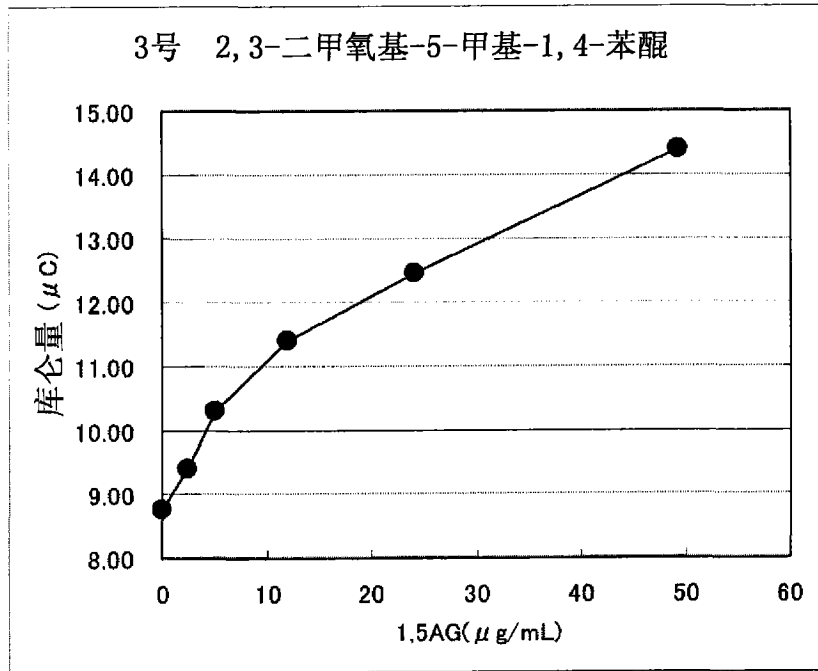


图 16

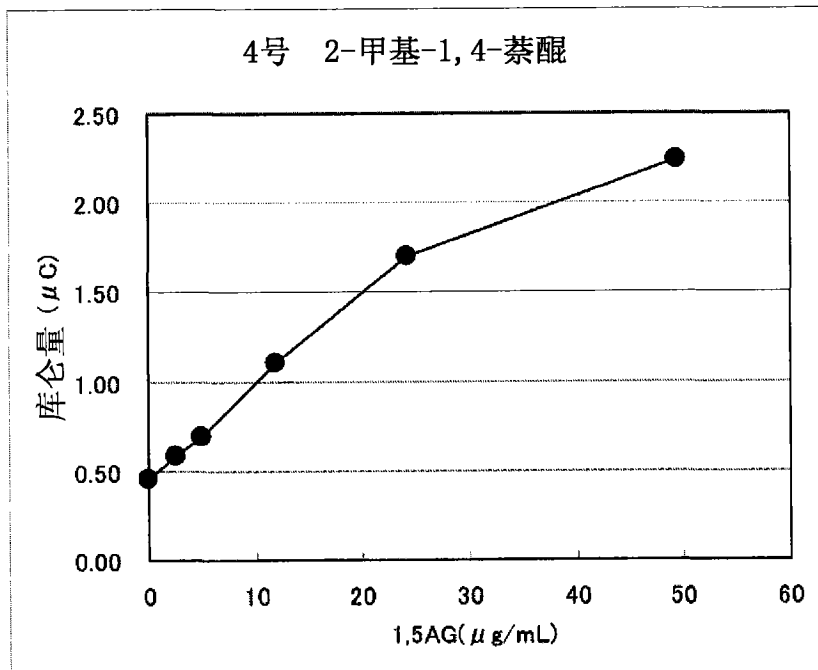


图 17

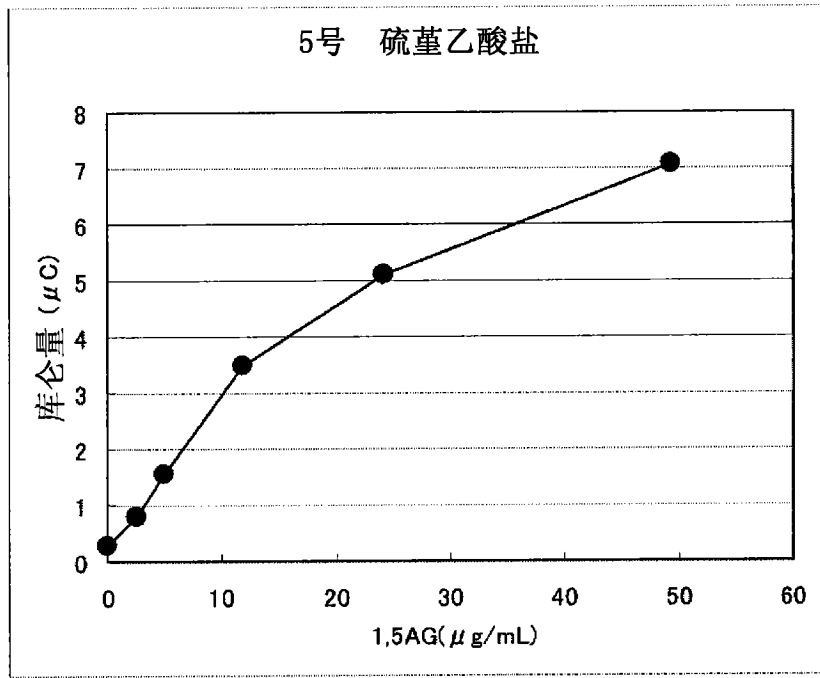


图 18

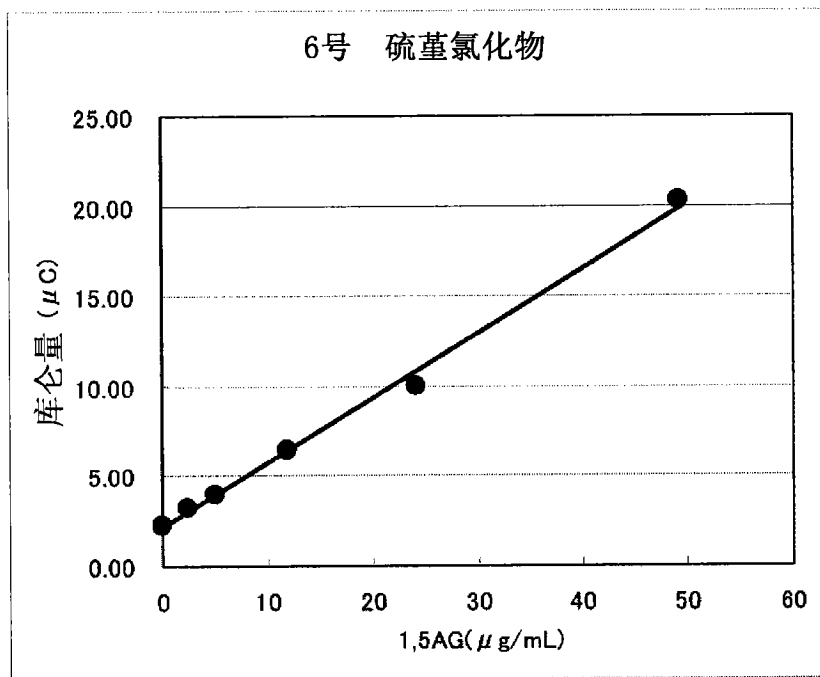


图 19

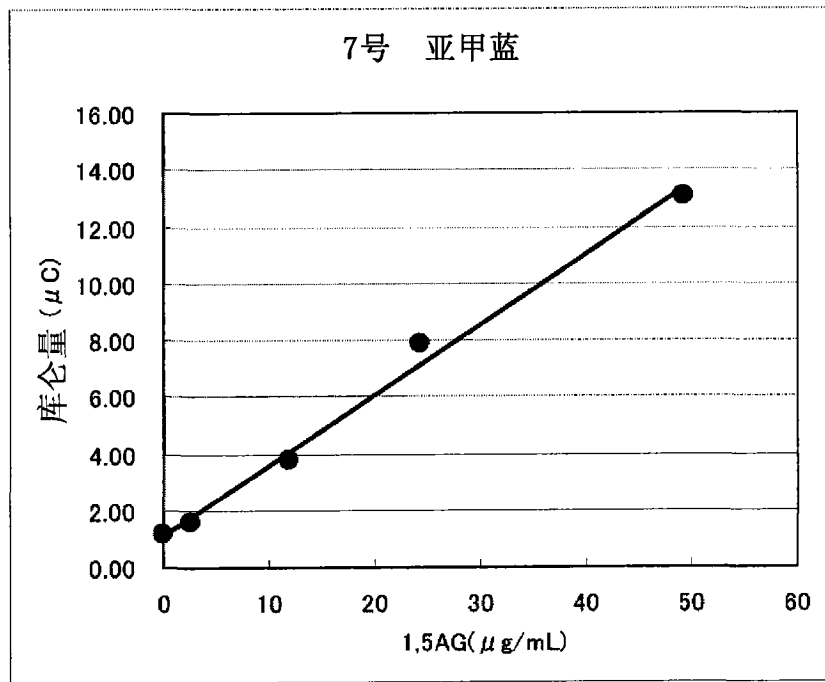


图 20

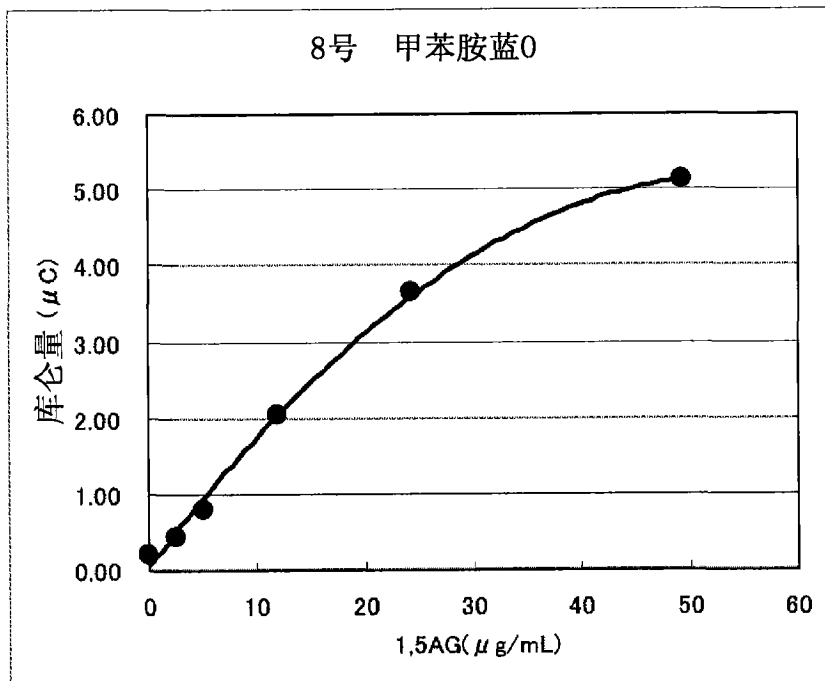


图 21

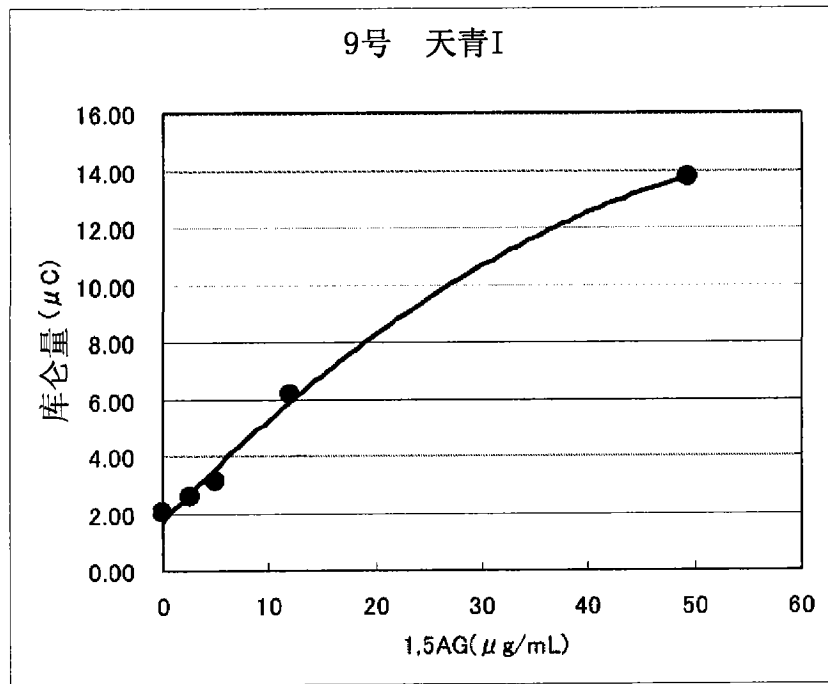


图 22

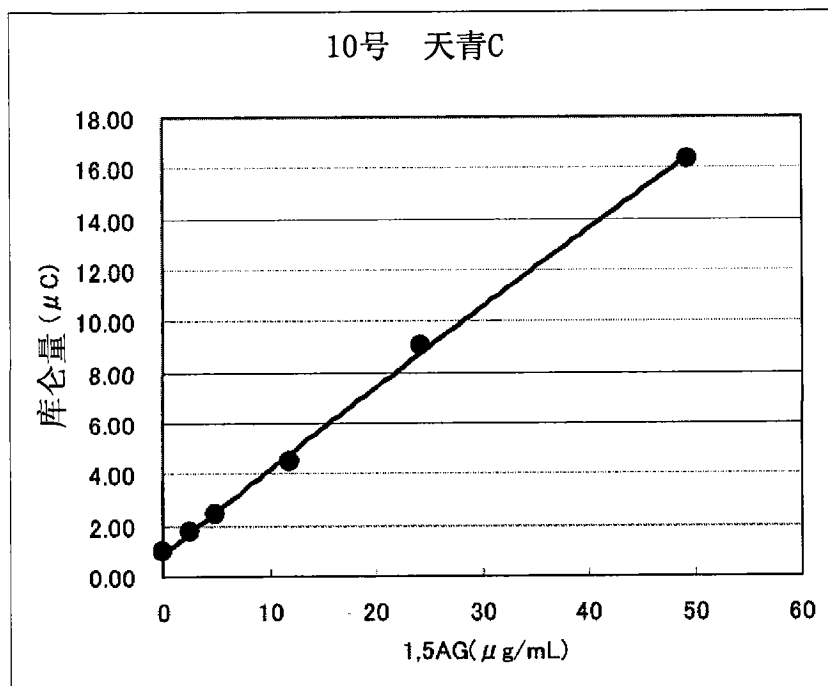


图 23

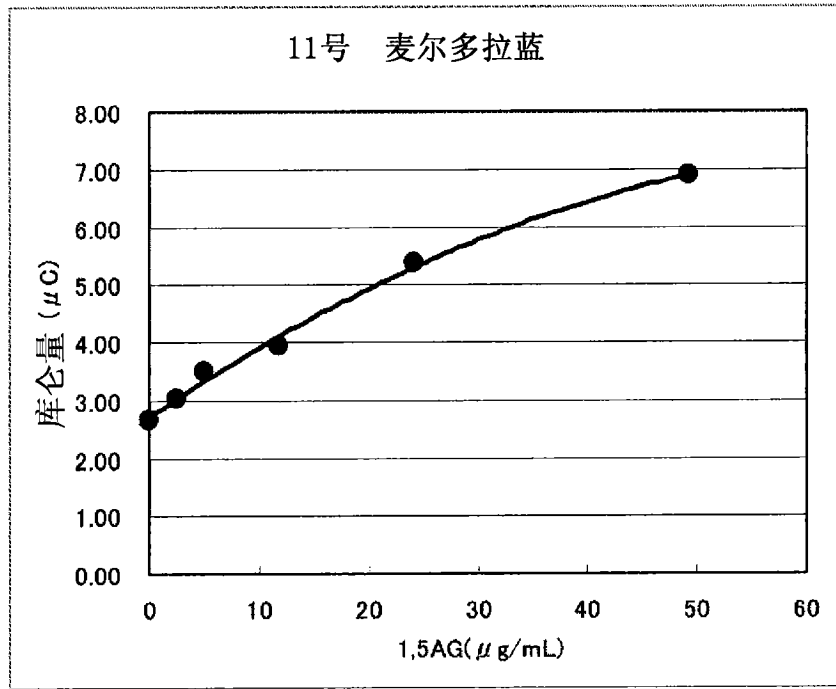


图 24

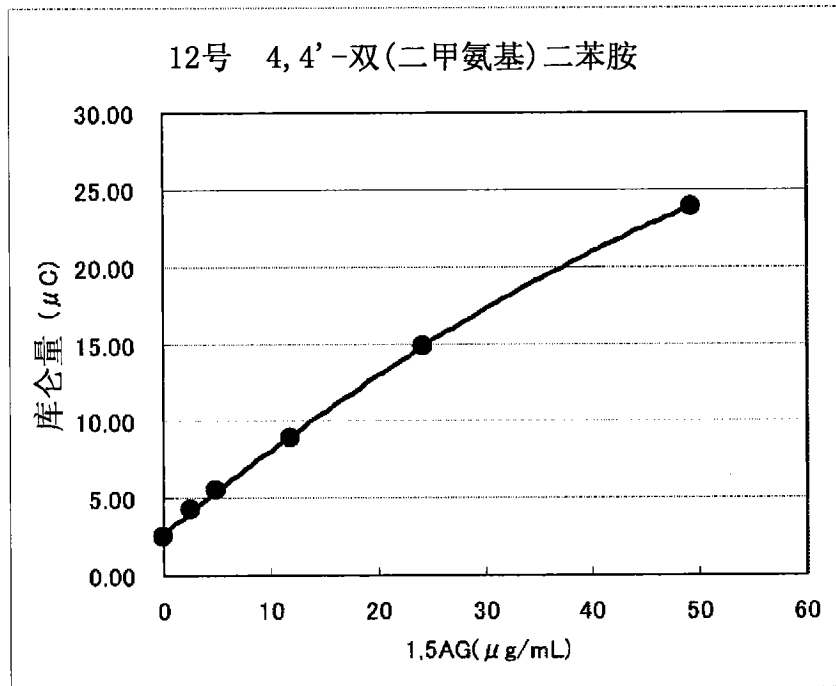


图 25

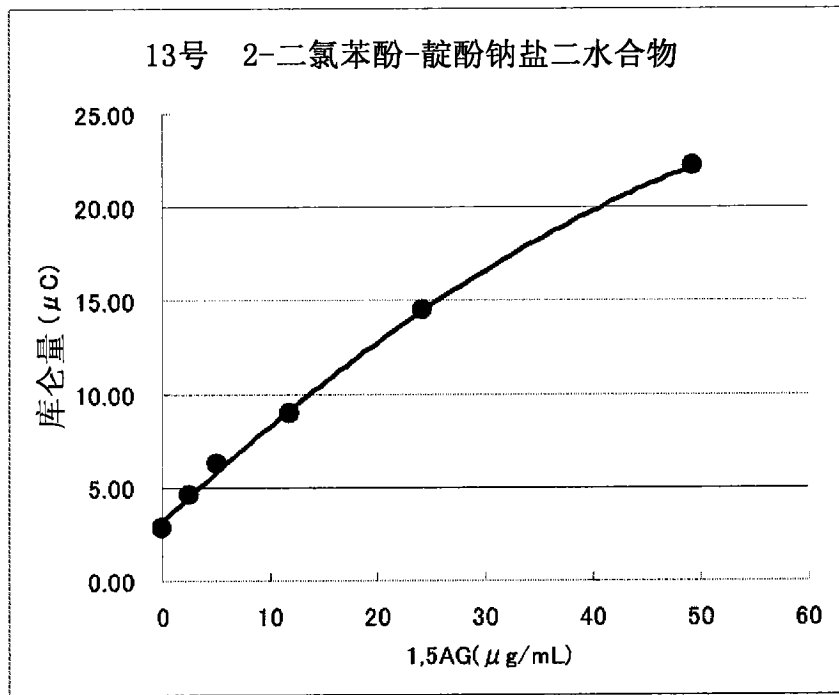


图 26

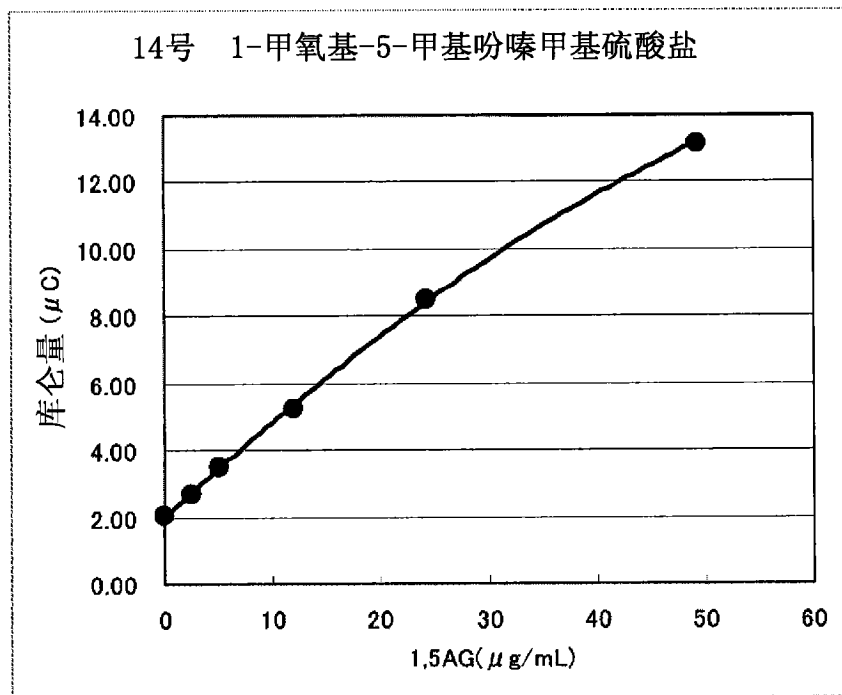


图 27

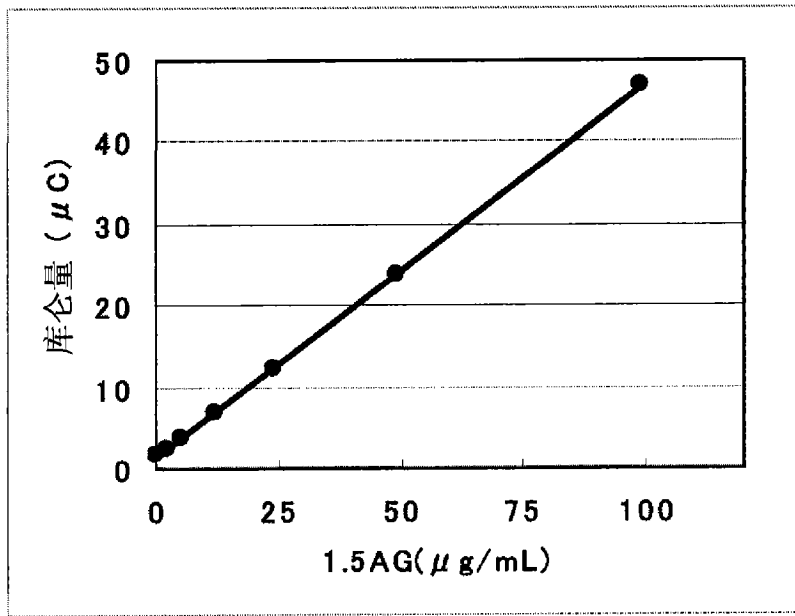


图 28

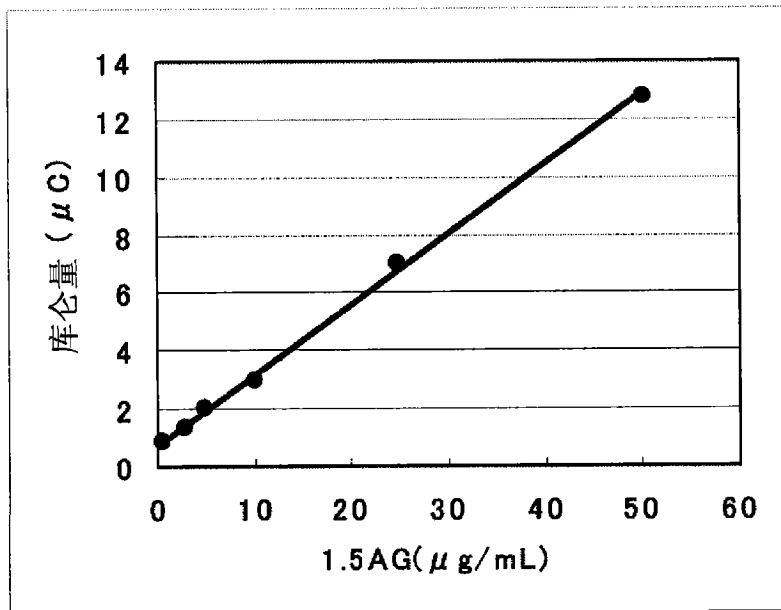


图 29

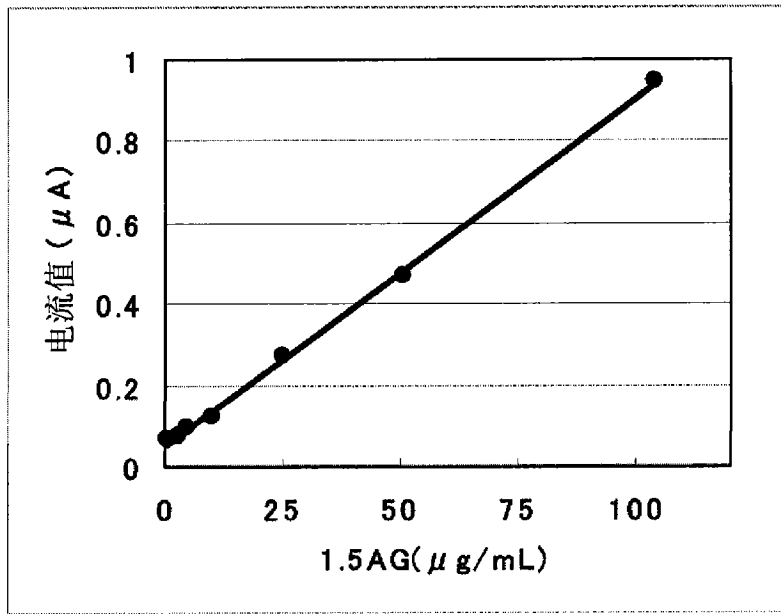


图 30

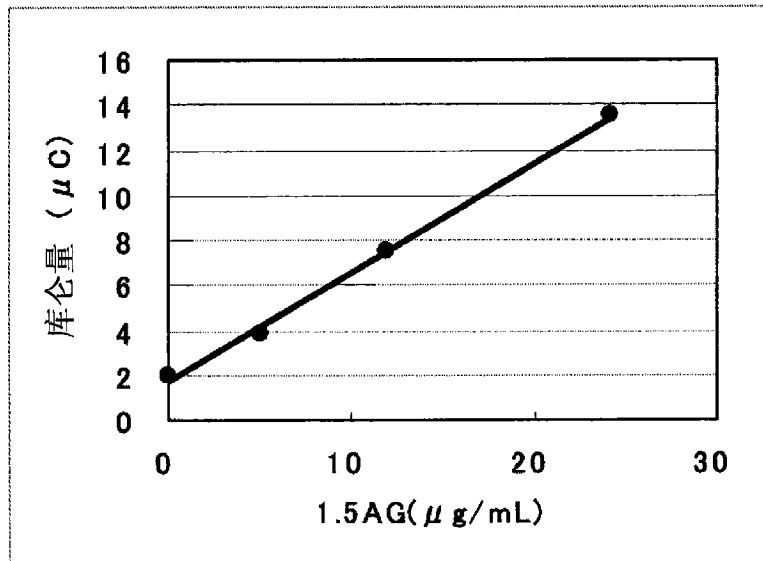


图 31

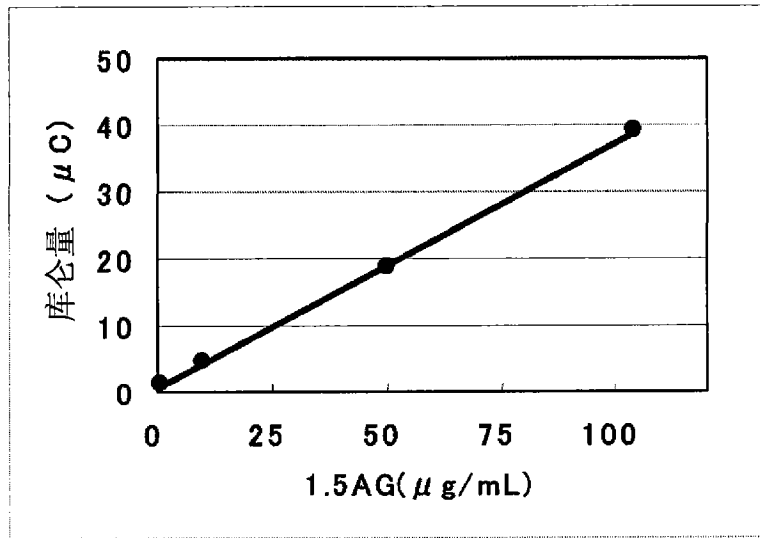


图 32