

450997

公告本

專利申請案第85103522

ROC Patent Appln. No.85103522

修正之中文說明書及申請專利範圍 - 附件

Amended Chinese Specification and Claims - Encl.

(民國86年9月15日送呈)

(Submitted on September 15, 1997)

86.9.03補充

申請日期	85.3.25
案 號	85103522
類 別	C12Q 1/26, 1/54, G01N 21/00

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書 50997
新 型

一、發明 名稱	中 文	用於直接讀取試劑測條的化學計時元件
	英 文	Chemical timer for a direct-reading reagent teststrip
二、發明 人	姓 名	1. 吉依特 (Ernest J. Kiser) 2. 湯米雪 (Michael F. Tomasco)
	國 籍	1、2、皆美國籍
三、申請人	住、居所	1. 美國加州洛特斯市格瑞街1564號 1564 Clay Drive, Altos, California 94024 2. 美國加州瑪頓市礁斯街801號 801 Church Street, Apt. 1202, Mountain View, California 94041
	代 表 人 姓 名	柯保羅 (Paul A. Coletti)

450997

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6

B6

本案已向：

美國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ☐有 ☒無主張優先權
西曆1995年3月27日 08/411238

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製



五、發明說明(1)

相關申請案之前後參照

本申請案係為1992年10月13日提出申請之共待審美國專利申請案序號960,579之部份連續案，而該共待審案係為1991年4月25日提出申請但目前已放棄之美國專利申請案序號691,192之連續案，而該案又為1989年8月28日提出申請但目前已放棄之美國專利申請案序號399,055之連續案，且本申請案亦為1991年7月26日提出申請之美國專利申請案序號736,537而專利編號為5,306,623之部份連續案。

發明背景1. 發明範圍

本發明係關於一種以化學方式測定時間間隔之裝置；更特定言之，係為一種測條度量分析物在生物溶液中之濃度之時間間隔。

2. 相關技藝之描述

已發展出許多目視測試裝置，以度量某些分析物在生物溶液中之濃度。此等裝置已用來度量例如血液、尿液或唾液中之葡萄糖、膽固醇、蛋白質、酮類、苯丙胺酸或酵素。

摻有以酵素為基礎之組合物之乾燥相試劑條，已廣泛地使用在臨床實驗室、醫師診療室、醫院及家庭中，以測試生物流體試樣之葡萄糖濃度。事實上，試劑條已變成許多國家之數百萬個糖尿病患者之每日必需品。由於糖尿病會

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

造成血液化學中之危險異常，故其可能助長視覺喪失、腎衰竭及其他嚴重醫療結果。為使此等結果之危險降至最低，故大部份糖尿病患者必須對其本身週期性地測試，然後據以調整其葡萄糖濃度，例如經過膳食控制及/或使用胰島素注射。一部份病人必須測試其血糖濃度，其頻繁程度達每日四次或更多。

尤其重要的是，糖尿病患者必須控制其飲食，以調整糖攝取及/或投予胰島素注射，且其必須就此點藉由不斷測試血液葡萄糖濃度作引導，使用快速、不昂貴及正確試劑條進行葡萄糖測定。

試劑條係為已知，其含有會轉變不同色澤之指示劑，依已被施加至試劑條上之生物流體中之葡萄糖濃度而定。雖然一些此等試劑條係使用還原化學物質，但其更常涉及一種可氧化染料或偶合染料。一些試劑條包含酵素，譬如葡萄糖氧化酶，其能夠使葡萄糖氧化成葡萄糖酸及過氧化氫。其亦含有一種可氧化染料及一種具有過氧化活性之物質，其能夠在過氧化氫存在下，選擇性地催化該可氧化染料之氧化作用(參閱，例如美國專利編號5,306,623)。

1976年6月22日頒予 Hochstrasser 之美國專利編號 3,964,871，揭示一種用後即棄指示劑條，用以直接度量物質，譬如生物流體中之葡萄糖。此指示劑係記錄該物質之濃度，其方式是於其中包含一種指示劑試劑，當其與該物質反應時會被氧化及改變顏色，以及一種"拮抗劑"，其係以某種方式防止已被氧化指示劑之蓄積，直到其已被完

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(3)

全消耗為止。

Palmer等人揭示一種對葡萄糖及其他分析物之"數字"定量檢測系統，1989年5月24日公告之歐洲專利申請案公告編號0 317 070 (亦參閱1991年7月30日頒予之美國專利編號5,036,000)。該系統係度量一種有機化合物在生物流體中之濃度，其方式是首先使用一種受質專一性氧化酶氧化該化合物，以產生過氧化氫。此系統包含一種色原，其係為過氧化氫之還原劑，以及一種空氣安定性過氧化氫還原劑，其具有較大還原潛力。此較大還原潛力會延遲藉由色原所致之任何可測得之顏色改變，直到該空氣安定性之第一種過氧化氫還原劑已被用完為止。因此，若欲被度量之過氧化氫係低於相應於該空氣安定性過氧化物還原劑濃度之預定程度，則不會造成顏色改變。結果，此系統係定量地度量其濃度，而與變色強度無關。

1987年3月10日頒予Ismail等人之美國專利編號 4,649,122 揭示一種可用性測試裝置，其係確認一種測試用組合物對於測定分析物濃度之可用性。可用性係藉由潤濕該裝置進行度量。當以水潤濕時，此測試會改變顏色或進行一些其他改變，以使得使用者確認該試劑條係為可用的。

無論此項測試係在家庭、醫師診療室、臨床或醫院，葡萄糖測定之準確度與再現性是極端重要的。在顏色顯示之試劑條之情況中，一般期望顏色改變係為顯著的，且對於包含在生物流體中葡萄糖以外之化合物之變異係為不敏感的。在目視讀取試劑條之情況中，對於可能已遭受視覺傷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

害之糖尿病患者而言，尤其重要的是應有一種測試試劑，其會依葡萄糖濃度而定，顯示出顯著顏色改變，惟藉由特定波長下吸光率改變所顯示之顏色改變，對於儀錶讀取試劑條之準確度亦很重要。

由於顏色改變係涉及一系列化學反應，故其不會瞬間發生。因此，使用者必須等候一段時間，典型上為一分鐘或較少，以讓反應進行。當儀錶讀取試劑條時，計時器電路可獲得顯示反應已完成之信號。但是，當試劑條以目視讀取而未使用儀錶時，使用者可能會低估所需要之時間，過早讀取試劑條，並獲得不正確結果。或者，使用者可能覺得在讀取試劑條之前，必須等待超過之時間，以確定反應完成，故造成沒有必要之延遲及使用者之不滿。因此，需要一種“化學”計時元件；意即，一種在試劑條上之元件，其會改變顏色而不管葡萄糖(或其他令人感興趣之分析物)在試樣中之濃度為何，但其只有在已經過足夠時間以完成與試樣之顏色形成反應後，才會因此。

發明摘述

根據本發明，一種供直接讀取試劑測條使用以度量分析物在生物流體中濃度之化學計時元件，使得試劑測條之使用者能夠確定其已等候足夠長之時間以獲得正確讀數，而使用者無需等待無節制之長時間。此計時元件包含下列物質之乾塗層

- a) 一種指示劑組合物；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

- b) 一種試劑，當其水合時，能夠與葡萄糖反應而使指示劑之顏色改變；
- c) 一種抑制劑，其會抑制指示劑顏色上之改變，及
- d) 葡萄糖，

其中抑制劑與葡萄糖在該乾塗層中之濃度係經選擇，以致在將生物流體試樣施加至試劑條上，歷經預定時間後，該葡萄糖會與試劑反應而改變指示劑之顏色。

於本發明之另一項具體實施例中，一種製備供直接讀取試劑測條使用以度量被施加至該測條之生物流體中分析物濃度之化學計時元件之方法，係包括以下步驟

- a) 於多孔性薄膜上塗覆一種試劑之溶液，當其水合時能夠與葡萄糖反應；
- b) 使該塗層乾燥以形成第一層；
- c) 於第一層上塗敷第二層，其含有
 - (i) 葡萄糖，
 - (ii) 一種指示劑，其能夠與該試劑及葡萄糖之反應產物反應，而造成顏色改變，及
 - (iii) 一種抑制劑，其會抑制指示劑顏色上之改變。

於操作上，一種用以度量分析物在生物流體中濃度之方法，係包括以下步驟

- (a) 將流體施加至測條，該測條包括
 - (i) 多個結果片段，當與含有至少預定量分析物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(6)

之流體接觸時，各片段會改變顏色，其與造成其他片段顏色改變之分析物量不同，及

- (ii) 一個計時元件片段，其在一段時間後會改變顏色，其延續時間係實質上與分析物在流體中之量無關，及

- (b) 觀察當計時元件片段改變顏色時，最後已改變顏色之結果片段。

此片條係為提供分析物濃度之目視指標之類型，該分析物係包含在被施加至片條之“試樣側”之生物流體中。此目視指標係呈現在片條之相反(或“測試”)側。當將流體試樣施加至試樣側時，及當典型上為顏色改變之相應目視指標呈現在測試側時，於兩者之間通常有時間上之延遲。因此，除非使用者在採取讀數之前，等候一段至少最低長度之時間，否則讀數可能會賦予不正確值。再者，適當最小延遲時間，可能會受環境上或片條化學性質上之改變所影響，例如環境溫度或老化作用。當從流體試樣被施加至片條之時間起，已經過一段足夠時間後，本發明之化學計時元件係對使用者提供目視指標。

測條之化學組成當然係依欲被度量之分析物 / 生物流體而定。測條可經設計以檢測分析物，譬如在生物流體中之葡萄糖或其他糖類、膽固醇、蛋白質、酮類、尿酸、苯丙胺酸或酵素，該生物流體譬如血液、尿液及唾液，以及水。一種供試劑測條用之化學計時元件，通常是，但並非必須是適合回應與試劑測條本身一樣之相同分析物 / 生物流體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

組合。此化學計時元件組合物，於乾燥形式中必須是安定的，且計時元件化學性質之任何老化作用，較佳係循著試劑與指示劑化學性質之老化作用。為方便與簡潔起見，在本專利說明書之大部份細節中所揭示之計時元件與試劑測條，係檢測血液中之葡萄糖。一般熟諳此藝者可容易地適應此揭示內容中之訊息，用以檢測其他分析物/生物流體組合。

本發明之一種指示劑條，係提供在無法測定之血液試樣中葡萄糖濃度之相對較簡易且快速測定。此片條包括一種具有試樣側與測試側之多孔性基質。此基質通常為一種薄膜，此兩種術語係可交換地使用在本發明專利說明書與隨文所附之申請專利範圍中。將測試用試劑塗敷至該基質，且達較多或較少程度，被浸漬在該基質之孔隙中。為簡化起見，在本專利說明書及在隨文所附之申請專利範圍中，吾人將基質上之試劑描述為“塗層”，認為此試劑塗層係穿透基質達某種程度。此基質適合接受無法測定之完整血液試樣，其含有紅血球與葡萄糖，被施加至試樣側上。基質之多孔性允許流體從試樣側朝向測試側通過，例如藉毛细作用。因此，測試用試劑可與血液中之葡萄糖反應，而造成在於或接近於測試側上之顏色改變。由於強烈帶色之紅血球會使其較難以檢測顏色改變，故基質可具有孔隙，其大小係從試樣側上之大孔隙漸變至測試側上之較小孔隙，以捕獲紅血球遠離測試側。可使用多種材料，作為本發明之指示劑條與計時元件之不同組件。一些此等材料係揭示於1994年4月26日頒予Kiser等人之美國專利編號 5,306,623

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

原

五、發明說明(8)

中，併於本文供參考。

測試用試劑係包含一種使葡萄糖轉化成過氧化氫之成份，譬如葡萄糖氧化酶，及一或多種用以檢測試樣中存在之葡萄糖所產生之過氧化氫之成份。用以檢測過氧化氫之成份可為一種過氧化酶，較佳為辣根過氧化酶，且伴隨著一種會在反應過程中改變顏色之“指示劑”。此指示劑可為一種可氧化染料或一種偶合染料。此過氧化酶會在過氧化氫存在下，催化該指示劑之氧化作用。此試劑測條塗層之最後一種元件為一種抑制劑，其會阻滯指示劑之顏色改變氧化作用。

於較佳具體實施例中，此指示劑條係沿著其長度方向分段，其方式係致使相鄰片段具有不同指示劑 / 抑制劑差額。吾人稱此等片段為“結果片段”。只有若且當足夠葡萄糖存在，而首先造成所有抑制劑被用光，及然後使指示劑氧化，於是造成特徵顏色改變時，一個特定結果片段才會改變顏色。因此，在一特定結果片段上之顏色改變，証實在最初血液試樣中之低限葡萄糖濃度。沿著此試劑條，在一特定方向上，各連續結果片段均具有抑制劑 / 指示劑差額，其係相應於低限葡萄糖濃度上之逐步增加。此可以下述方式達成，例如若指示劑濃度對所有片段均相同，但各連續片段均比緊接於前之片段具有逐步較大之抑制劑濃度。顯然地，其他抑制劑 / 指示劑差額亦可行。

對特定試樣而言，若此等結果片段具有適當範圍內之指示劑 / 抑制劑濃度，則相鄰片段與分析物反應，以致使一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(9)

個結果片段被著色，而相鄰片段則否。該結果表示在試樣中之葡萄糖濃度係至少等於為改變一個片段顏色所需要之低限濃度，但並未大到改變相鄰片段顏色所需要之程度。為監測血液葡萄糖，故此計時元件塗層包括之元件為指示劑條，其為一種其上塗有測試用試劑之多孔性基質，及另外為葡萄糖。於其乾燥狀態下，該試劑化學性質並未被葡萄糖活化，但當將試樣施加至該片條時，計時元件塗層係被水合，故在一段預定時間後，於塗層中之葡萄糖會造成該指示劑改變顏色。葡萄糖於計時元件中之存在量，較佳係遠超過克服抑制劑所需要之量。於該情況中，所需要之時間係較長或較短，依有多少抑制劑存在而定。於片條中及於計時元件中之顏色改變，可直接藉眼睛或使用一種檢測反射度改變之光學儀器觀察。

顯現計時元件指標所需要之時間，亦受片條參數所影響，此參數同樣地會影響為顯現葡萄糖濃度之目視指標所需要之時間。因此，若片條成份之低環境溫度或老化作用，使得葡萄糖濃度之有效度量所需要之時間延長，則其亦會使化學計時元件指標之時間延長。最後，若片條處理不當，例如曝露於濕氣中，會造成顏色改變，其係顯示在片條使用之前，化學計時元件反應已進行完成，使用者係被警告片條事實上已變得不正確，並明瞭不得使用之。

附圖簡述

圖1為本發明直接讀取試劑測條之基質之透視圖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

圖 2 為本發明直接讀取試劑測條之測試側之平面圖。

圖 3 為圖 2 片條之試樣側之平面圖。

發明詳述

本發明之計時元件，係以化學方式度量預定時間間隔。其特別適合包含在直接讀取試劑測條上，用以度量分析物在生物流體中之濃度。此種測條包括一種多孔性基質，其中摻有一種測試用試劑，其會回應被施加至片條上之生物流體試樣中之分析物，而進行顏色改變。

基質可為均勻組合物，或可為經塗覆之基材，並可為各向同性或各向異性。其具有一個試樣側，試樣係塗敷於其上，及一個測試側，於此處觀察顏色改變。較佳情況是，此基質係為一種各向異性薄膜；更佳情況是，具有大範圍孔隙尺寸之各向異性薄膜。例如，從約0.1微米至約150微米之孔隙尺寸梯度，可延伸經過基質。在大孔隙端，孔隙尺寸更佳係在約30微米至約40微米之範圍內。於其中孔隙最小之基質端，空隙體積係相對較小，且薄膜之材料通常十分稠密，在一層中可構成高達薄膜厚度之10% - 20%。在此層中，孔隙尺寸較佳係在約0.1至約0.8微米之範圍內，其中額定孔隙尺寸較佳為約0.3 微米。當將生物流體施加至試樣側時，在試樣穿透薄膜時，其會遭遇逐漸變小之孔隙。最後，譬如紅血球之固體，會抵達其在薄膜中無法進一步穿透之位置。此試樣之其餘部份，仍然含有已溶解之葡萄糖，會穿透經過而達測試側。薄膜之各向異性本性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11.)

及 / 或分離成份(於下文討論)在基質中之使用，允許相對較快速流率經過薄膜，即使是固體之過濾正在發生亦然。

當試樣通過基質時，與試劑之反應會造成光吸收性染料在接近測試側之空隙體積中形成或分解，於是實質上影響來自基質之反射度。

聚風與聚醯胺(尼龍)係為適當基質材料之實例。具有可比擬性質之其他聚合體亦可使用。此等聚合體可經改質，以引進其他可提供帶電結構之官能基，以致基質之表面可為中性、陽性或陰性。

一種製備多孔性材料以形成該基質之較佳方法，係為將聚合體鑄膜，無需支撐核芯。此種基質係為例如各向異性聚風薄膜，可得自Mentec公司(Timonium, MD.)。經常採用一種低於約200微米厚度之基質，其中以約115至155微米較佳。約130至140微米之厚度為最佳，特別是當基質為尼龍或各向異性聚風時。基質可視需要連接至載體，以賦予其物理形式與剛性，惟這是不必要的。較佳情況是，載體係經由將基質夾在熱塑性薄片之間所提供。於試樣側上之薄片包括一個開孔，試樣可經過其間引進。於測試側上之薄片允許基質測試側之顏色可被見及。

薄膜可使用測試用試劑處理，其方式是將其浸漬在諸成份之互混物中，於是使薄膜基質飽和。過量試劑可藉機械方式移除，例如刮刀或玻璃棒。然後使薄膜乾燥。

測試用試劑包括(i)一種使葡萄糖轉化成過氧化氫之成份，(ii)一種用以檢測過氧化氫之成份，及(iii)一種成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(12)

份，其係用以抑制檢測過氧化氫之成份。此試劑可視需要進一步包含一種分離成份，其會造成譬如紅血球之固體變成連接至或捕獲在基質中，有效地自生物流體中移除固體。其他成份亦可包含在內，如下文及實例中所述。

用以轉化葡萄糖成為過氧化氫之較佳成份，係包括葡萄糖氧化酶，其為一種經常得自黑曲霉或青霉屬之酵素。葡萄糖氧化酶會與葡萄糖及氧反應，以產生葡萄糖酸內酯與過氧化氫。最適宜葡萄糖氧化酶濃度，係依指示劑系統之組合物而定。例如，若指示劑系統為MBTHSB-ANS（其係描述於下文），則在約500-10,000 U./毫升範圍內之葡萄糖氧化酶係為適當的，更佳為約700-2000 U./毫升，且最佳為約1000 U./毫升。一般而言，較高濃度之葡萄糖氧化酶會造成反應進行得更迅速，且反之亦然。

經如此製成之過氧化氫，會與用以檢測過氧化氫之成份反應，其包括過氧化酶，其係選擇性地催化過氧化氫與指示劑間之反應。過氧化酶係使用過氧化氫作為氧化劑，其能夠自各種基材上移除氫原子。適當過氧化酶可含有鐵原卟啉，其為一種得自植物之紅色血晶質。得自動物之過氧化酶，例如得自動物之甲狀腺，亦適合。辣根過氧化酶（HRPO）係特佳地作為該用以檢測過氧化氫之成份之一種組份。

過氧化氫，較佳係藉過氧化酶催化，會反應而直接地或間接地形成或分解一種指示劑染料，此染料會吸收預定波長範圍內之光線。較佳情況是，此指示劑染料強烈地吸收

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (13)

之波長，係與測試用試劑強烈地吸收之波長不同。指示劑之經氧化形式，可為帶有顏色、輕微帶色或無色之最後產物，其証實基質測試側之顏色改變。換言之，測試用試劑可藉由有色區域被漂白，或者藉由無色區域顯色，而指示有分析物存在於試樣中。

可使用於本發明中之指示劑，係包括(a)3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脞鹽酸鹽(MBTH)與3,3-二甲胺基苯甲酸(DMAB)併用；(b)MBTH與3,5-二氯-2-羥基苯-磺酸(DCHBS)併用；(c)4-胺基反苯甲菲(4-AAP)(在4毫克/毫升下)與5-氧基-1-(對-磺苯基)-2-吡啶啉-3-羧酸(OPSP)；(d)4-AAP(在4毫克/毫升下)與N-(間-甲苯基)-二乙醇胺(NDA)；(e)2,2'-次偶氮基-二(3-乙基苯并噻唑啉)磺酸(ABTS)；(f)4AAP(在4毫克/毫升下)與4-甲氧基萘酚；(g)五倍子酚紅(PGR)；(h)溴基五倍子酚紅(BPR)；(i)酸綠25 (AG)；或(j)[3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脞]N-磺醯基苯磺酸單鈉(MBTHSB)，與8-苯胺基-1-萘磺酸銨(ANS)併用。MBTHSB-ANS係為較佳。關於MBTHSB-ANS之其他訊息，係呈現在1994年9月8日提出申請之共待審美國專利申請案序號302,575 中，且併於本文供參考。

抑制成份係阻滯過氧化氫與染料或染料先質間之反應，例如藉由還原過氧化氫或藉由還原經氧化之染料。原則上，對抑制劑有兩種不同操作模式。首先，抑制劑可能會與指示劑競爭，於是減緩顏色改變在指示劑中進行之速率。或者，抑制劑可為非競爭性，以致在任何實質上顏色改變

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

發生於指示劑中之前，實質上所有抑制劑均被消耗。較佳情況是，本發明之抑制劑係藉後述機制操作。

於適當抑制劑範圍中，特別是2,3,4-三羥基苯甲酸；乙醇酸丙酯；3,4-二羥基桂皮酸；3,4-二羥基苯甲醛；沒食子酸；5,6-二氨基尿嘧啶；抗壞血酸；及異抗壞血酸。以抗壞血酸較佳；但是，抗壞血酸會在溶液中氧化，且必須被安定化，以允許試劑被塗覆。較佳安定劑為一級醇類，譬如乙醇、甲醇或丙醇。以乙醇較佳，特別是濃溶液；意即，50%或更多乙醇之溶液。

雖然各向異性薄膜係為較佳基質，其會濾出紅血球，且保持彼等遠離測試側，但視需要而定，該測試用試劑亦可含有一種分離成份。此分離成份應能夠自含有紅血球之流體，例如完整血液，藉由多價螯合基質中之紅血球，而產生相對較澄清之無色流體。供使用於本發明中之分離成份，係包括但不限於聚乙二醇、聚（甲基乙烯基醚／順丁烯二酸）酐、聚丙二醇、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇及聚乙烯基磺酸，其pH值在約4.0-8.0之間。此種分離成份係存在於基質中，其量係依其電荷與分子量、被包埋在基質中之其他成份、基質pH值與孔隙尺寸及基質於乾燥後之殘留水份而改變。此種參數可容易地由熟諳此藝者測定。例如，當採用聚丙二醇作為分離成份時（例如，PPG-410，得自BASF, Wyandotte, MI），其較佳係以約2-30%重量對體積(w/v)存在，且更佳為8-10%w/v。其他分離成份亦可以約2-30%w/v之濃度採用。可將此聚合體分離成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15.)

份浸漬或包埋在基質中。一些水溶性鹽亦可達成此種分離。於適合用以分離血液成份之鹽類中，特別是檸檬酸鹽、甲酸鹽及硫酸鹽，以及某些酸類，譬如胺基酸類、檸檬酸、肌醇六磷酸及蘋果酸（參閱，例如，1971年1月5日頒予 M.C. Fetter. 之美國專利 3,552,928）。包含分離成份之一項優點係為其中譬如紅血球之固體係實質上被移離該生物液體，故在測試位置上較不會有背景顏色會遮蔽藉由測試用試劑所產生之著色之改變。

可將其他成份包埋在基質中，以增強試劑條之著色及可讀性，及保持基質之均勻性與完整性。例如，測試用試劑可包含鹽類及 / 或緩衝劑，以幫助染料在基質中之分離。此種緩衝劑可包含例如檸檬酸，以約 0.01 M 至約 1.0 M 存在於溶液中，且較佳為約 0.1 M。其他酸性緩衝劑亦可採用。

使基質成為親水性之化合物或可充作安定劑之化合物，譬如水解蛋白質，亦可採用。此種化合物包括但不限於，例如牛血清白蛋白、多肽及低分子量蛋白質，可以 Crotein SPA 取得 (CRODA 公司, New York, N.Y.)。此種化合物係以例如約 1.0 毫克 / 毫升至約 100.0 毫克 / 毫升之濃度使用。在 Crotein 之情況中，以約 20 毫克 / 毫升較佳。

其他安定劑與防腐劑亦可包含在基質之塗層中。例如可採用乙二胺四醋酸 (EDTA)、二乙三胺五醋酸 (DTPA) 及相關化合物，其濃度例如約 0.01 毫克 / 毫升至約 10.0 毫克 / 毫升。於防腐劑之目的中，特別是幫助抑制劑安定化。

五、發明說明 (16.)

一些指示劑(例如, BPR) 具有在基質中潛移之不期望傾向。當使用此種指示劑時, 係包含一種離子配對劑, 以防止此種潛移。例如, 可以Polyquart (H) (Henkel 公司, Ambler, PA) 市購而得之聚乙二醇衍生物, 係為特別有用的, 因其具有促進指示劑與其他基質取代物間之離子配對之能力。

當藉由顏色形成(例如, MBTHSB-ANS)指示有分析物存在時, 可添加界面活性劑以使顏色增亮, 並增強與未帶色周圍之對比。

有機溶劑亦可採用於本發明之實作上, 並可包含在供基質用之測試用試劑之配方中, 其條件當然是其可與基質及測試用試劑組合物相容。可能適合之有機溶劑包括氯仿、丙酮、醇類、二氯甲烷、乙醚與石油醚、乙腈及其混合物。於本發明之實作上, 70%乙醇在水中為特佳。

經塗覆在基質上或經浸漬至基質中之測試用試劑, 並非均勻覆蓋在測條之表面上。而是, 此試劑較佳係以一系列平行片條或"結果片段", 經塗敷至基質上, 其中在鄰接結果片段中之組合物係逐步增加抑制劑濃度。因此, 各後續片段需要逐步較大之葡萄糖濃度在試樣中, 以造成片段改變顏色。

基質之計時元件片段係塗覆或浸漬一種組合物, 其係由測試用試劑及另外為葡萄糖所組成。由於此測試用試劑之目的係為回應葡萄糖以改變顏色, 故將此兩種物質合併而不會造成顏色改變, 需要些許小心。必須存在超過計時功用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (17.)

所需要量之抑制劑，以補償此作用。在塗敷含有葡萄糖之溶液後，使計時元件片段乾燥之速率係經控制。實際上，係首先將薄膜塗覆一種含有緩衝劑、安定劑及酵素之溶液，並使該塗層乾燥以形成第一層。然後，第二個塗層係經由塗敷一種含有指示劑、抑制劑及葡萄糖之溶液，以形成第二層。諸項參數，譬如網片速度、烘箱溫度與空氣流量、及經沈積塗層溶液之量，係已被預先固定，並對抑制劑及 / 或葡萄糖濃度進行適當調整。以一種非較佳之替代方式，替代塗敷該第二層作為塗層，係包括在個別網片上製造第二個塗層，然後將其層合在第一層上。

當將試樣施加至該片條上時，計時元件片段組合物之水合作用，會允許顏色形成反應進行。然後，計時元件片段改變顏色所花費之時間，係藉溫度及藉測試用試劑之特性測定，特別是抑制劑濃度、葡萄糖之量及水合作用與氧擴散速率。

可使計時元件顏色改變之時間，作成依葡萄糖在試樣中之濃度而定，或者，與該濃度無關。經由在計時元件中摻入極大過量之葡萄糖，則此時間係實質上與試樣之葡萄糖濃度無關。經由在計時元件中摻入較少葡萄糖，則可使得此時間係依試樣中之葡萄糖而定；意即，若葡萄糖在試樣中之濃度愈大，則計時元件改變顏色愈快。葡萄糖在計時元件中之濃度較佳係大於約1500毫克 / 公合，其使得計時元件實質上與在約40-400毫克 / 公合範圍內之試樣葡萄糖濃度無關。此計時元件片段組合物係包含過量之會使葡萄糖轉化成過氧化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

張

訂

五、發明說明 (18.)

氫之成份(譬如葡萄糖氧化酶)以及葡萄糖。於是，計時元件組合物應包含與具有最高抑制劑濃度(其係相應於最高葡萄糖讀數)之結果片段至少一樣多或較多之抑制劑。

此計時元件亦充當重要之品質管制功能，其方式是當測條已因曝露於濕氣下而被污染時，使其顯而易見。測條必須保持乾燥直到其被使用時為止，因為會使葡萄糖轉化成過氧化氫之成份(通常為酵素)，在曝露於濕氣時具有降解之傾向。因此，若此片條過早地曝露於濕氣，其將變成被污染且不能使用。但此測條之污染對使用者並非顯而易見，因此，其可能會使用此一片條並獲得錯誤結果。然而，若此片條包括計時元件片段，則曝露於濕氣會造成計時元件改變顏色，其會警告使用者片條已被污染之事實。

現在參照附圖進一步描述本發明。圖1顯示本發明之基質10，用以度量分析物在生物流體中之量。雖然係以弧形位置顯示，但基質10係為可撓性，且在使用時一般係呈平坦平面。此基質包括一個試樣側12，生物流體試樣係施加於其上，及一個測試側14，於其上或其附近之顏色改變表示有分析物存在。此顏色改變係由於分析物與被浸漬在孔隙16中之試劑之交互作用所造成。為度量葡萄糖在血液中之濃度，孔隙尺寸較佳係在接近試樣側12相對較大，而在趨近測試側14則降低尺寸。孔隙尺寸梯度係用以捕獲接近試樣側12之紅血球，以致使其顏色不會干擾觀看顏色改變之能力，該顏色改變係表示有分析物存在。

四個結果片段a、b、c及d係以圖式顯示。各後續片段係

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(19.)

比前一片段具有逐步較多之抑制劑。因此，例如，若試樣造成片段a、b及c改變顏色，而d不會(如圖1中所示)，則意謂在該試樣中之葡萄糖濃度係至少與消耗片段c之抑制劑含量所需要者一樣大，但並不足以克服片段d中之抑制劑。一旦此結果片段經校準，則該結果會產生葡萄糖濃度之定量度量。片段t，意即計時元件，除了在結果片段中所浸漬之測試用試劑以外，係摻有高濃度之葡萄糖。在片段t中之抑制劑，係至少與結果片段中一樣大，且消耗片段t中抑制劑所需要之時間，係至少與消耗其他片段中抑制劑所需要之時間一樣多。因此，當片段t進行顏色改變時(如圖1中所示)，足夠時間已過去，而造成在全部結果片段中之顏色改變，其抑制劑濃度係足夠低，而被試樣中之葡萄糖濃度消耗，且可進行正確度量無需進一步延遲。

在一實際測條中，圖1之基質係被夾在兩個覆蓋薄片之間，其可為此項技藝中所習知之任何適當熱塑性薄膜。圖2與3個別為測條20之試樣側22與測試側24之平面圖。於使用時，係將血液試樣施加至試樣側22上之開孔26。試樣係藉毛細作用，以縱向方式朝向片條之頂部與底部擴散，並透過基質朝向測試側24。選用之通氣孔28有助於試樣沿著片條擴散。試樣經過選用透明窗30而出現，可確認已提供足夠試樣供度量。於測試側24上之指示劑圓圈，係容許顏色形成反應所需要之氧進入，且係經標識以顯示血液葡萄糖濃度。當測試進展時，若在試樣中之血糖濃度符合或超過相應於該圓圈之量，則於測試側24上之指示劑圓圈會

五、發明說明 (20)

相繼地改變顏色。因此，描繪於圖3中之結果，表示試樣葡萄糖濃度係為至少120毫克/公合，但低於150毫克/公合。於計時元件圖圍32改變顏色後，可在任何時間下取得讀數。注意附圖，經由與葡萄糖反應所造成之顏色改變，係從白色至帶有顏色。但是，此系統可以替代方式操作，使用一種指示劑染料，其係被葡萄糖所引致之氧化作用破壞，相應之顏色改變係從帶有顏色至白色。

為更良好地明瞭本發明，下述實例係進一步說明本發明之各種具體實施例。此等實例並非意欲以任何方式作為限制。

實例1 - BPR 指示劑

製備下列溶液：

酵素溶液

蒸餾水	83.5克	0.2M烏頭酸	27.0克
1%(w/w)EDTA Na ₂	23.8克	葡萄糖氧化酶	165,000 U
烏頭酸	6.0克	HRPO	340,000 U
NaOH(固體)	2.2克		
Crotein SPA	4.2克		
咪唑	0.6克		
甘露醇	3.0克		
5%(w/w) Surfactol Q1	3.0克		
調整pH值至4.80			
乙醇	40.0克		
PPG-410	5.6克		
酵素溶液	28.0克		

五、發明說明 (21.)

將Memtec BTSH 55薄膜在此溶液中浸漬塗覆，並將過量使用玻璃棒刮除。將已塗覆之薄膜在浮離乾燥機中，於180F及適度空氣流量下乾燥，以致使網片在20秒內實質上乾燥。將網片纏繞在線軸上，準備進行下述第二個塗層。

製備下列溶液：

抗壞血酸鹽(抑制劑)儲備溶液		稀釋劑
蒸餾水	190克	370克
1%EDTA Na ₂	55克	107克
BPR	0.36克	0.71克
PolyQuart [®] H	6克	11.8克
PPG-410	14.2克	27.8克
抗壞血酸	1.37克	--
乙醇	243克	477克

計時元件溶液

稀釋劑(依照上述配方)	120克
抗壞血酸	0.885克
葡萄糖溶液*	17.25克

* 葡萄糖溶液為葡萄糖在水中之16,000毫克 / 公合溶液，使其變旋24小時，經冷凍儲存。

製備該儲備溶液之下列稀釋液：

0.0405 : 1、0.108 : 1、0.236 : 1、0.369 : 1、0.569 : 1、1.260 : 1。在抑制劑濃度上之此種逐步增加，係相應於結果圖圈所報告之逐步較大葡萄糖濃度。將此等溶液，伴

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(22)

隨著計時元件溶液，並排塗覆於裝填酵素薄膜之大孔隙側，以在每平方毫米薄膜上沈積約 1.15×10^{-4} 毫升。在按上文關於酵素塗覆步驟所述，歷經相同乾燥條件之前，使薄膜潤濕約十五秒。結果顯示計時元件係在約70秒內反應，其中約95%之結果落在64與79秒之間。

實例2 - MBTHSB-ANS 指示劑

製備下列溶液：

HPLC 水	1500毫升
檸檬酸	16.92克
檸檬酸鈉	20.88克
甘露醇	15克
EDTA二鈉	1.26克
Gantrez S95	6.75克
Croton SPA	36克
葡萄糖氧化酶	1.69 MU
HRPO	1.5 MU
Carbopol 910*	75毫升
檸檬酸二鈉**	225毫升

* 11%溶液，在乙腈中

** 0.1M, pH值5.0

將Memtec BTS 35 薄膜在貯槽中塗覆，以致使大孔隙之表面接觸塗覆溶液；以前述方式，使用玻璃棒移除過量溶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (23)

液。按實例 1 使薄膜乾燥並纏繞在線軸上。

製備下列溶液：

溶液A (指示劑)		溶液B(潤濕劑)	
70%(v/v)乙醇	2819毫升	Maphos [®] 60A	41克
MBTHSB	2.98克	70%(v/v)乙醇	205毫升
(NH ₄)ANS	25.83克		
溶液B	205毫升		
2%DTPA	51.25毫升		
溶液C(抗壞血酸鹽儲備液)		溶液D(計時元件)	
水	115毫升	水	53毫升
抗壞血酸	4.58克	抗壞血酸	8.75克
乙醇	267毫升	乙醇	123毫升
		使用70%EtOH使體積增至175毫升	
		葡萄糖溶液	40.5毫升

對各抑制劑溶液，使溶液A之體積固定在263毫升。對各種結果圓圈，使 70%EtOH：溶液C 之比例從58.9 改變至0.200，以致使經添加至溶液A之70%EtOH + 溶液C之體積，對所有抑制劑溶液均為87.5毫升。這可有效地僅改變抑制劑在各溶液中之濃度。將含有逐步增加抑制劑濃度之溶液及計時元件溶液(溶液 D)，並排塗覆於薄膜之大孔隙側。沈積速率係經調整，以達成每平方毫米薄膜 $\sim 8 \times 10^{-5}$ 毫升抑制劑。將此薄膜按上述乾燥，惟在塗覆與乾燥間之延遲為約1.6分鐘。結果顯示計時元件係在約60 秒內反應，對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

頁

五、發明說明 (24)

於來自血液分血器從30至55%之試樣，或從78至420 毫克 / 公合之葡萄糖，幾乎無影響。

熟諳此藝者應明瞭的是，前述說明與實例係為實施本發明之說明例，絕非限制。於本文中所提出細節之變異，在未偏離本發明之範圍與精神下均可進行。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



四、中文發明摘要(發明之名稱：用於直接讀取試劑測條的化學計時元件)

一種供直接讀取試劑測條用之化學計時元件，在將生物流體施加至該片條後之預定時間，其會改變顏色。此片條係度量分析物在流體中之濃度。此計時元件為一種乾塗層，其包含一種指示劑，一種當水合時能夠與葡萄糖反應以改變指示劑顏色之試劑，一種會抑制指示劑顏色改變之抑制劑及葡萄糖。該試劑與葡萄糖較佳係以過量存在於該塗層中，且計時元件顏色改變所花費之時間，可藉該抑制劑濃度加以控制。

英文發明摘要(發明之名稱：CHEMICAL TIMER A DIRECT-READING REAGENT TEST STRIP)

A chemical timer for a direct-reading reagent test strip changes color a predetermined time after a biological fluid is applied to the strip. The strip measures the concentration of an analyte in the fluid. The timer is a dry coating of an indicator, a reagent that when hydrated can react with glucose to change the color of the indicator, an inhibitor to inhibit the change in color of the indicator, and glucose. Preferably the reagent and glucose are present in excess in the coating, and the time it takes for the timer color to change can be controlled by the inhibitor concentration.

六、申請專利範圍

公告本

1. 一種供直接讀取試劑測條使用以度量被施加至該片條上之生物流體中葡萄糖濃度之化學計時元件，此計時元件包含下列物質之乾塗層

- a) 一種指示劑組合物，
- b) 一種試劑，當其水合時，能夠與葡萄糖反應而使該指示劑之顏色改變，
- c) 一種抑制劑，其會抑制指示劑顏色上之改變，及
- d) 葡萄糖，

其中該抑制劑與葡萄糖在該乾塗層中之濃度係經選擇，以致在將該生物流體施加至片條上，歷經預定時間後，該葡萄糖會與試劑反應而改變指示劑之顏色。

2. 根據申請專利範圍第1項之計時元件，其中該生物流體為血液。

3. 根據申請專利範圍第1項之計時元件，其中該指示劑係選自包括溴基五倍子酚紅(BPR)；或[3-甲基-2-苯並噻唑啉酮脞]N-磺醯基苯磺酸單鈉(MBTHSB)，與8-苯胺基-1-萘磺酸銨(ANS)併用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

夾

六、申請專利範圍

4. 根據申請專利範圍第3項之計時元件，其中該染料為 MBTHSB-ANS。
5. 根據申請專利範圍第1項之計時元件，其中該試劑包括一種氧化酶。
6. 根據申請專利範圍第5項之計時元件，其中該氧化酶為葡萄糖氧化酶。
7. 根據申請專利範圍第1項之計時元件，其中該抑制劑包括抗壞血酸。
8. 一種直接讀取試劑測條，其係用以度量被施加至該片條上之生物流體中葡萄糖之濃度，該片條包含根據申請專利範圍第1項之化學計時元件。
9. 一種製備供直接讀取試劑測條使用以度量被施加至該測條上之生物流體中葡萄糖濃度之化學計時元件之方法，其包括以下步驟
 - a) 於多孔性薄膜上塗覆一種試劑之溶液，當該試劑水合時，能夠與葡萄糖反應，
 - b) 使該塗層乾燥以形成第一層，
 - c) 於第一層上塗敷第二層，其含有
 - (i) 葡萄糖，
 - (ii) 一種指示劑，其能夠與該試劑及葡萄糖之反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



六、申請專利範圍

應產物反應，而造成顏色改變，及

(iii) 一種抑制劑，其會抑制指示劑顏色上之改變

。

10. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該試劑包括葡萄糖氧化酶。

11. 一種用以度量葡萄糖在生物流體中濃度之方法，其包括以下步驟

(a) 將該流體施加至測條，該測條包括

(i) 多個結果片段，當與含有至少預定量葡萄糖之流體接觸時，各片段會改變顏色，其與造成其他片段顏色改變之葡萄糖量不同，及

(ii) 一個計時元件片段，其在一段時間後會改變顏色，其延續時間係實質上與葡萄糖在流體中之量無關，及

(b) 觀察當計時元件片段改變顏色時，最後已改變顏色之結果片段。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

束



450997

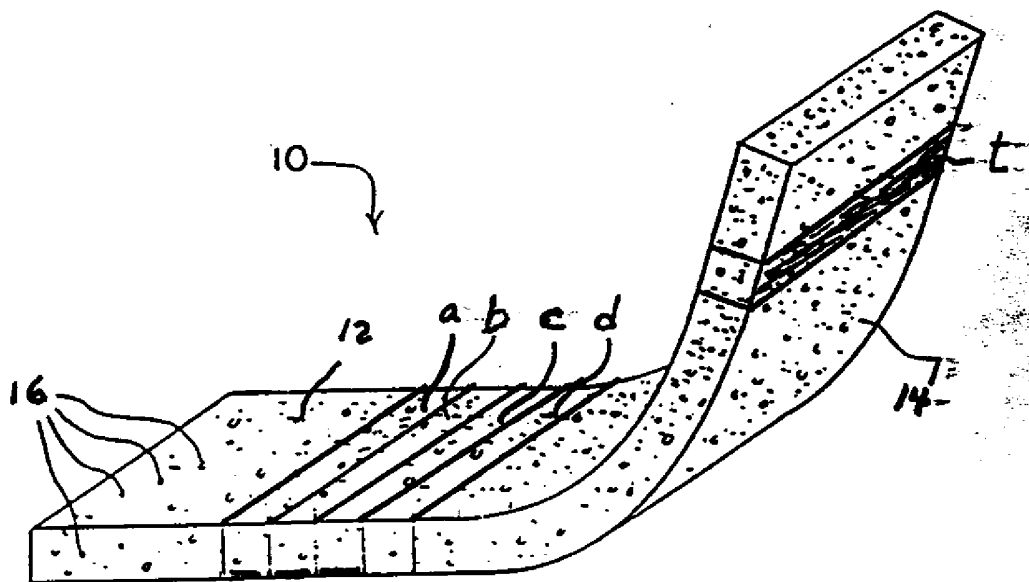


圖 1

450997

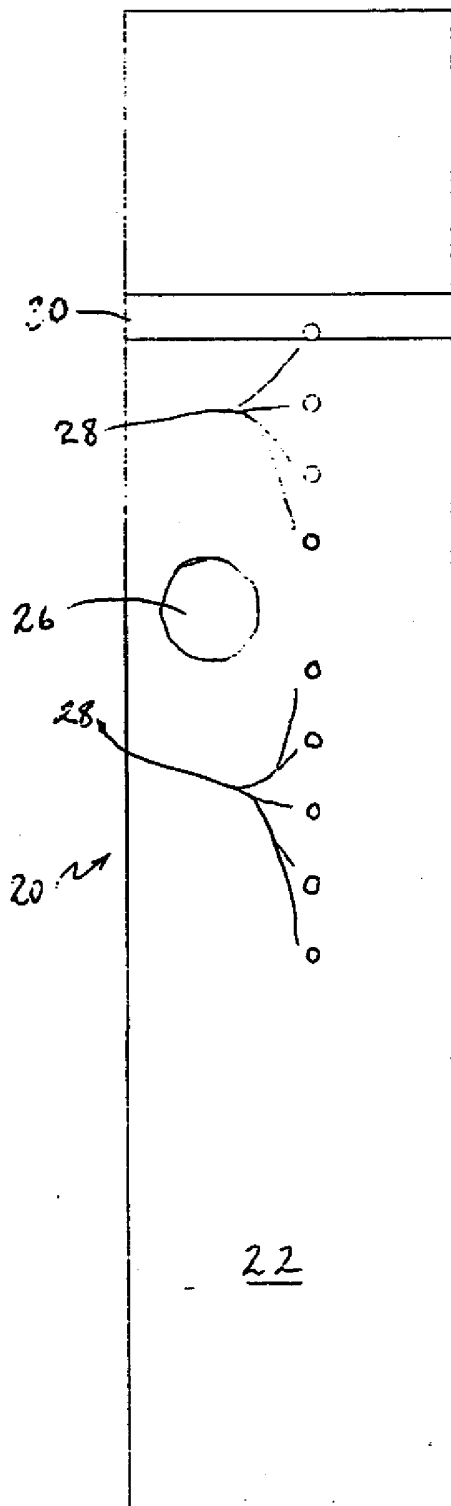


圖 2

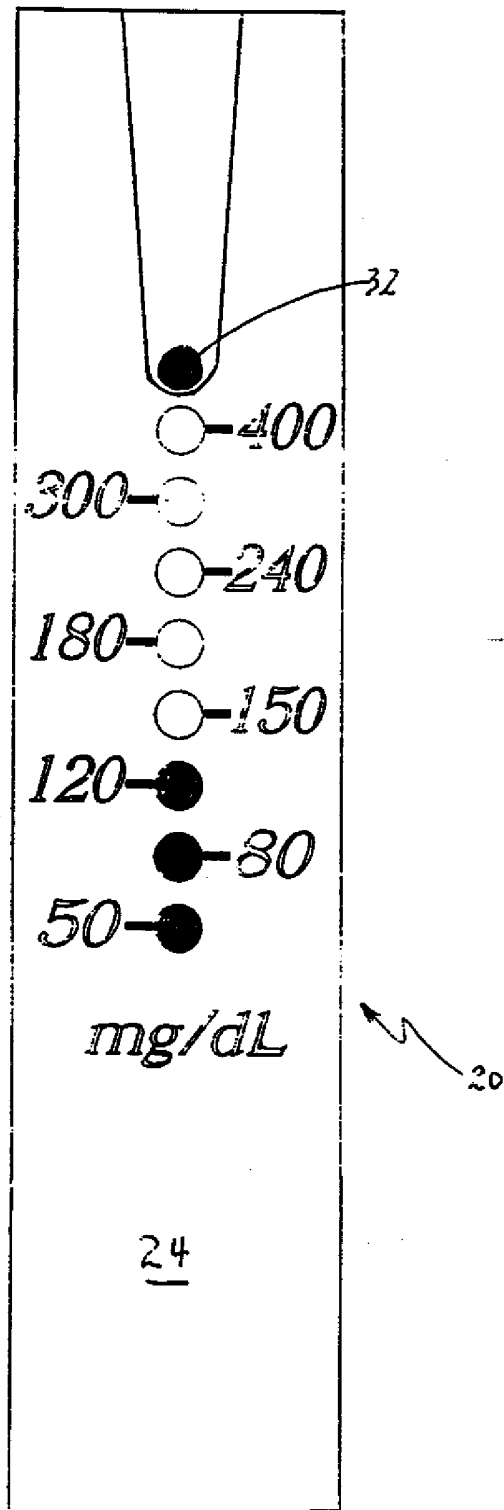


圖 3

450997

公告本

專利申請案第85103522

ROC Patent Appln. No.85103522

修正之中文說明書及申請專利範圍 - 附件

Amended Chinese Specification and Claims - Encl.

(民國86年9月15日送呈)

(Submitted on September 15, 1997)

86.9.03補充

申請日期	85.3.25
案號	85103522
類別	C12Q 1/26, 1/54, G01N 21/00

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書 50997

一、發明 名稱	中 文	用於直接讀取試劑測條的化學計時元件
	英 文	Chemical timer for a direct-reading reagent teststrip
二、發明 人	姓 名	1. 吉依特 (Ernest J. Kiser) 2. 湯米雪 (Michael F. Tomasco)
	國 籍	1、2、皆美國籍
	住、居所	1. 美國加州洛特斯市格瑞街1564號 1564 Clay Drive, Altos, California 94024 2. 美國加州瑪頓市礁斯街801號 801 Church Street, Apt. 1202, Mountain View, California 94041
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商來富肯公司 LifeScan, Inc.
	國 籍	美國籍
	住、居所 (事務所)	美國加州密爾派塔市吉瑞大道1000號 1000 Gibraltar Drive, Milpitas, California 95035, U.S.A.
	代 表 人 姓 名	柯保羅 (Paul A. Coletti)