



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849559 A

(43) 申请公布日 2010.10.06

(21) 申请号 201010181510.5

(22) 申请日 2010.05.25

(71) 申请人 浙江康特生物科技有限公司

地址 312500 浙江省绍兴市新昌县省级高新技术产业园区(七星街道铁圈山2号)

(72) 发明人 尹鹏 安东辉

(74) 专利代理机构 浙江翔隆专利事务所 33206

代理人 张建青

(51) Int. Cl.

A01N 65/42 (2009.01)

A01P 1/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/52 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂

(57) 摘要

目前的生物防腐剂可替代硫汞撒、叠氮化钠和庆大霉素等物质,效果理想,但因其价格昂贵,现在只少量用于临床研究。本发明提供了一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于所述的防腐剂采用蒜汁,其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的 0.5% -6.0%。本发明首次采用蒜汁作为体外诊断试剂盒防腐剂,不仅对试剂盒能够进行有效的防腐、稳定,同时,蒜汁中富含的氨基酸对免疫透射比浊类试剂盒抗体液起到一定的加速反应的作用,是免疫试剂盒中抗体液的保护剂,使测定结果准确。

1. 一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于所述的防腐剂采用蒜汁,其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的 0.5% -6.0%。
2. 根据权利要求 1 所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于蒜汁的用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的 0.5% -3.5%。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于蒜汁由大蒜中提取,其采用浸泡提取法提取法。
4. 根据权利要求 3 所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于浸泡提取法的过程如下:取新鲜大蒜,去皮捣碎成糊状,所得的蒜泥加入乙醇溶液,密封放置 10-20 天,离心去渣,滤液抽滤,将滤液减压蒸馏去除乙醇即可。
5. 权利要求 1 或 2 所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于将其应用于免疫透射比浊类试剂盒。
6. 权利要求 5 所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于将其应用于视黄醇结合蛋白测定试剂盒。
7. 权利要求 1 或 2 所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于将其应用于转氨酶测定试剂盒。
8. 权利要求 7 所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于将其应用于丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒。

一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂

技术领域

[0001] 本发明涉及医学体外诊断领域,具体地说是一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂。

背景技术

[0002] 防腐剂是体外诊断试剂盒必不可少的成份,它能防止试剂盒因微生物的生长引起的腐败变质,使试剂盒在规定的环境中具有一定的有效性。目前国内外试剂盒大多数采用化学剂,而采用的这些防腐剂中大部分都具有毒性,部分具有腐蚀性,对使用者及环境都潜在很大的危险性及污染。

[0003] 现有诊断试剂盒中常用的防腐剂有硫柳汞、叠氮钠、抗生素等。

[0004] 硫柳汞在 ELISA(酶联免疫反应)试剂中曾普遍使用,但因其有毒,现较少或几乎不使用。市面许多试剂盒产品,用抗生素(如庆大霉素)做防腐剂较多,较叠氮钠试剂毒性作用小,但试验过程中发现抗生素类药物根据其化学结构有着不同的抗菌谱,抗菌谱最广的也仅仅限于大部分的原核微生物,无法对全部微生物起效。因此,抗生素只是可以对抗细菌,但是不能对抗除细菌外的其它微生物,且长时间不能达到完全防腐的作用。

[0005] 叠氮钠是目前体外诊断试剂盒最常用的防腐剂,虽然其防腐效果尚好,但其对过氧化特酶、抗体的活性都有一定的抑制作用。此外,叠氮钠已纳入 2008 年的剧毒化学品来管理。叠氮钠和氰化物相似,对细胞色素氧化酶和其它酶有抑制作用,并能使体内氧合血红蛋白形成受阻,有显著的降压作用。对眼和皮肤有刺激性,如吸入、口服或经皮肤吸收,可引起中毒死亡;同时,受热、接触明火、或受到摩擦、震动、撞击时可发生爆炸。叠氮钠与酸类剧烈反应会产生爆炸性的叠氮酸,与重金属及其盐类会形成十分敏感的化合物。可见叠氮钠虽然为试剂盒最常用的防腐剂,但在使用过程中对人体、环境潜在着较大的危险性。

[0006] ProClin 系列防腐剂是 SUPELCO 公司推出新一代高效生物防腐剂,可以有效地控制体外诊断试剂中微生物的生长。当浓度达到 0.02% 条件下,ProClina 系列防腐剂具有广谱抗菌活性,能在比较长的时间内抑制细菌、真菌和酵母菌等微生物的生长;同时,它又能保持体系中酶的活性,因此它是一种理想的可替代硫汞撒、叠氮化钠和庆大霉素等物质的生物防腐剂,但因其价格昂贵,现在只少量用于临床研究。因此,目前寻找一种价格合适、有效且无毒害作用的试剂盒防腐剂是非常必要的。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种价格合适、无毒性、无腐蚀性、对使用者及环境均无潜在危险且能够提升体外诊断试剂盒性能指标的防腐剂。

[0008] 为此,本发明采用如下的技术方案:一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于所述的防腐剂采用蒜汁,其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的 0.5% -6.0%,最优选为 0.5% -3.5%。

[0009] 蒜汁有效成分大蒜素的分子式为 $C_6H_{10}OS_2$,具有抗念球菌属菌、隐球菌属菌和须

发癣菌等抗菌作用,是一种杀菌效果很理想的广杀菌剂,其作用原理为:大蒜素独特的分子结构使它具有浓烈的大蒜气味。大蒜素的杀菌作用主要是因为其中的二烯丙基硫醚具有独特的生物活性。烯丙基是共轭结构基团,它的电负性较高,可部分地给毗邻的硫原子提供电子,使硫的缺电子性减小,活性增大,且能产生一定量的具生物活性的含硫基团,而许多含硫基团是已知的有效杀菌剂,能破坏细菌的蛋白质合成等生理过程。蒜汁的主要特点就是抗菌广谱,抑菌力强,且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、霉菌都具有极强的杀灭作用,可有效地抑制试剂盒中细菌的生长。

[0010] 上述的体外诊断试剂盒防腐剂,蒜汁由大蒜中提取,其采用浸泡提取法,其过程如下:取新鲜大蒜,去皮捣碎成糊状,所得的蒜泥加入乙醇溶液,密封放置 10-20 天,离心去渣,滤液抽滤,将滤液减压蒸馏去除乙醇即可。

[0011] 本发明对防腐剂的用量确定过程如下:蒜汁与试剂的比例按 0.5%、1%、1.5%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0% 配制了 11 个试剂盒(以视黄醇结合蛋白测定试剂盒为例),防腐剂的用量不影响试剂盒的有效成份及性能指标作为前提,结果如下表:

[0012]

试剂盒性能 蒜汁用量	空白吸光度值	分析灵敏度 (mg/L)	准确度 (质控偏差)	批内精密密度	线性范围 (1-130mg/L 范围内,相关系数 r 应不小于 0.9900)
0.5%	0.026	0.56	3.6%	3.2%	0.9989
1.0%	0.028	0.66	4.2%	3.4%	0.9999
1.5%	0.026	0.58	3.7%	3.3%	0.9998
2.5%	0.025	0.62	4.0%	3.4%	0.9996
3.0%	0.027	0.72	3.8%	3.5%	0.9997
3.5%	0.029	0.66	4.5%	3.7%	0.9999
4.0%	0.025	0.88	5.1%	4.0%	0.9996
4.5%	0.027	0.93	6.2%	4.7%	0.9989
5.0%	0.026	0.99	6.6%	5.2%	0.9987
5.5%	0.025	0.63	7.3%	5.4%	0.9997
6.0%	0.028	0.72	8.5%	5.8%	0.9999
可接受范围	≤0.05	≤1mg/L	±10%	≤6%	0.9900

[0013] 上述实验数据表明,蒜汁的用量在 0.5% -6.0% 范围内,RBP 测定试剂盒的各项技术指标均在可接受范围内,但在 0.5% -3.5% 范围内各项指标测定结果为最理想状态。

[0014] 本发明对防腐效果的确定如下:

[0015] 因为在 0.5% -3.5% 范围内各项指标测定结果为最理想状态,所以配制含蒜汁 0.5%、1.0%、1.5%、2.5%、3.0%、3.5% 系列浓度的 RBP 测定试剂盒,效期后 12 个月,观察试剂盒的技术指标,直至效期后 13 个月,结果如下:

[0016]

试剂盒 性能 蒜汁用量	空白吸 光度值	分析灵敏度 (mg/L)	准确度 (质控偏差)	批内精密度	线性范围 (1-130mg/L 范围 内, 相关系数 r 应 不小于 0.9900)
0.5%	0.026	0.56	3.6%	3.2%	0.9989
1.0%	0.028	0.66	4.2%	3.4%	0.9999
[0017] 1.5%	0.026	0.58	3.7%	3.3%	0.9998
2.5%	0.025	0.62	4.0%	3.4%	0.9996
3.0%	0.027	0.72	3.8%	3.5%	0.9997
3.5%	0.029	0.66	4.5%	3.7%	0.9999
可接受范围	≤0.05	≤1mg/L	±10%	≤6%	0.9900

[0018] 采用蒜汁作为防腐剂的防腐效果与叠氮钠的防腐效果进行了比较(视黄醇结合蛋白测定试剂盒均为近效期批号,第 12 个月),结果如下:

[0019]

防腐剂的 比较结果	蒜汁 (本申请)	叠氮钠 (同类试剂盒)
试剂 2 (抗体液) 的 外观	试剂为微黄色透明液体, 外观清透,	试剂为微黄色液体, 肉眼可见混浊,
空白吸光度	0.035	0.312
灵敏度(mg/L)	0.43	12.5
准确度(质控偏差)	3.3%	11.2%
批内精密度	3.4%	7.3%
线性范围	0.5-130mg/L 范围内, 相关系 数为 0.9998	0-110mg/L 范围内, 相关系数 r 为 0.9328

[0020] 通过上述表格中的比较数据,可以看出本申请采用蒜汁作防腐剂,试剂盒中试剂 2 (主要是抗体) 的外观及试剂盒的各项技术指标方面都较市场上采用叠氮钠作为防腐剂

的同类产品优越。

[0021] 蒜汁不仅具有防腐功能,而且因其富含丰富的氨基酸,而众所周知,氨基酸是最常用的蛋白保护剂,抗体本身就是免疫球蛋白。所以,蒜汁还对免疫比浊试剂盒中的抗体具有保护作用,能够保持抗体原来的活性,使抗体与抗原能够更快的反应形成抗原抗体复合物。而叠氮钠正好与蒜汁相反,虽然能够对试剂盒防腐作用,但同时配或抗体也有抑一定的抑制作用,这样,使得测定结果偏低。此外,大蒜中最重要的酶是蒜酶,1分子蒜酶约连有6个磷酸吡哆醛,磷酸吡哆醛又是转氨酶的预活化剂,可以对测定血清中的转氨酶进行活化,避免了因试剂盒无磷酸吡哆醛而造成测定结果假性偏低(目前国内转氨酶测定试剂盒中基本都不含磷酸吡哆醛)。丙氨酸氨基转移酶(ALT),它的升高通常都为肝细胞损伤所致,其中又可分为两类,一类是ALT的极度升高,一般由病毒性肝炎、药物性肝炎或肝性休克所引起的大的肝损伤所造成,它的ALT的测定范围一般在100~4000IU/L之间。另一类则反映中度的肝细胞损伤,通常由酒精性肝炎、传染性单核细胞增多症和多肌炎所引起,它的ALT测定范围一般为30~300IU/L。ALT的参考范围为5~40IU/L,它们含意仅指有95.5%的健康人其ALT测定值是在这一区间之内,但其医学决定水平则有三个,第一个决定水平是300IU/L,它可区别上述肝细胞损伤的二个临床类型,300IU/L以上的值表示极度的肝细胞损伤。第二个决定水平是60IU/L,此值比参考值上限高50%左右,因为一般当ALT测定值在40~60IU/L之间时,并不能确定ALT的升高是否属于病理性改变,许多不很健康的肥胖者,其ALT值就通常浮动在这范围之内,只有当ALT值大于60IU/L时,才可明确诊断为肝细胞损伤,所以它是一个确认值。ALT的第三个医学决定水平是20IU/L-比参考值限还低,这是一个排除值,低于此值则可排除许多与ALT升高有关的疾病。因此,ALT测定结果的准确性对于临床判断具有很重要的意义。目前国内试剂盒几乎都不含磷吡哆醛,主要原因是此成份加入对于试剂盒的稳定性有很大的影响,所以,患者血清的实际测定结果偏低,测定结果滞后于病情的现状。

[0022] 本发明首次采用蒜汁作为体外诊断试剂盒防腐剂,不仅对试剂盒能够进行有效的防腐、稳定,同时,蒜汁中富含的氨基酸对免疫透射比浊类试剂盒(如视黄醇结合蛋白测定试剂盒)抗体液起到一定的加速反应的作用,是免疫试剂盒中抗体液的保护剂,使测定结果准确;此外,蒜汁含有磷酸吡哆醛,磷酸吡哆醛本身就是转氨酶的预活化剂,对血清中的转氨酶能够起到一定的预活化的作用,使测定结果准确且与病情相符。由此可见,蒜汁对于体外诊断试剂盒确实为一种具有双效功能的防腐剂,是一种较为理想的新型体外诊断试剂盒防腐剂;此外,蒜汁从大蒜中提取,来源容易,价格便宜,使用安全,对使用者、环境无任何潜在危险,因此,很适易应用在体外诊断试剂盒中。

具体实施方式

[0023] 实施例1:

[0024]

[0025] RBP测定试剂盒,试剂盒配方:

[0026] R1:pH7.4磷酸盐缓冲液 45mmol/L

[0027] 聚乙二醇6000 78mmol/L

[0028] 乙二胺四乙酸二钠 10.2mmol/L

- [0029] 蒜汁 0.5%
- [0030] R2 :
- [0031] 鼠抗人单克隆抗体 2ml/L
- [0032] 兔抗人多克隆抗体 3ml/L
- [0033] pH7.4 磷酸盐缓冲液 45mmol/L
- [0034] 乙二胺四乙酸二钠 10.2mmol/L
- [0035] 蒜汁 0.5%
- [0036] 本实施例描述的视黄醇结合蛋白测定试剂盒,适合于各种类型的全自动生化分析仪,以日立 7060 全自动生化分析仪为例,其操作如下:
- [0037]

加入物	空白管	校准管	质控管	样品管
蒸馏水	3 μ l			
校准品		3 μ l		
质控品			3 μ l	
试剂 1	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l
混匀, 37°C 孵育时间 5 分钟, 读取吸光度 A1				
试剂 2	160 μ l	160 μ l	160 μ l	160 μ l
混匀, 37°C 孵育时间 5 分钟, 读取吸光度 A2				

- [0038] 结果计算:
- [0039] 多点定标:采用非线性定标中的 Spline 方程式,仪器自动生成定标曲线,根据定标曲线可自动计算出样品中的 RBP 浓度。
- [0040] 表 1、以本申请蒜汁为防腐剂的视黄醇结合蛋白测定试剂盒血清反应曲线数据。
- [0041]

反应时间 (秒)	吸光度值 (ABS)	反应平衡率的计算 (以 300 秒时为终点计算)
----------	------------	--------------------------

[0042]

0	0.003	0.5%
60	0.169	29.7%
90	0.284	49.9%
120	0.398	70.0%
150	0.489	85.9%
180	0.548	96.3%
210	0.566	99.5%
240	0.567	99.6%
270	0.568	99.8%
300	0.569	100%

[0043] 表1中,血清与试剂反应到180秒时已经完成了整个反应的96.3%,试剂盒的反应一般情况下以完成整个反应的95%以上即可认定达到平衡。所以,血清与试剂反应180秒就已经达到平衡。

[0044] 表2、以叠氮钠为防腐剂的视黄醇结合蛋白测定试剂盒(试剂盒其他成份同上)血清反应曲线数据。

[0045]

反应时间 (秒)	吸光度值 (ABS)	反应平衡率的计算 (以 300 秒时为终点计算)
0	0.003	0.52%
60	0.098	17.2%
90	0.180	31.6%
120	0.267	46.9%
150	0.348	61.2%
180	0.426	74.9%
210	0.498	86.9%
240	0.547	96.1%
270	0.564	99.1%
300	0.569	100%

[0046] 表 2 中, 同浓度的血清与试剂反应到 240 秒时才完成整个反应的 96.1%, 与表 1 比较, 反应速度明显减慢。

[0047] 采用的两种不同防腐剂的测定试剂盒与同浓度血清进行反应的数据及曲线图进行验证, 采用蒜汁作防腐剂, 可以保持抗体的活性, 加速反应抗体的反应。而采用叠氮钠作防腐剂, 反应明显减慢, 也同时说明叠氮钠在进行防腐的同时, 对抗体、抗原的反应有一定的抑制作用。

[0048] 实施例 2:

[0049] 丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒

[0050] R1: Tris 缓冲液 100mmol/L;

[0051] α -酮戊二酸 15mmol/L;

[0052] NADH 0.24mmol/L;

[0053] LDH 3.0KU/L;

[0054] 蒜汁 2.5%

[0055] R2: L-丙氨酸 1.5mmol/L。

[0056] 蒜汁 2.5%

[0057] 本实施例描述的丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒, 适合于各种类型的全自动生化分析仪, 以日立 7060 全自动生化分析仪为例, 其操作如下:

[0058]

加入物	空白管	校准管	质控管	样品管
蒸馏水	15 μ l			
校准品		15 μ l		
质控品			15 μ l	
试剂 1	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l
混匀, 37°C 孵育 1-5 分钟;				
试剂 2	160 μ l	160 μ l	160 μ l	160 μ l
混匀, 37°C 延迟 1 分钟, 连续监测 1-3 分钟各管吸光度变化, 计算 $\Delta A/\text{min}$				

[0059] 结果计算:

[0060] $\text{ALT}(\text{U/L}) = (\Delta A \text{ 测定} / \text{min} - \Delta A \text{ 空白} / \text{min}) \times 3376$

[0061] 3376 为在波长 340nm/405nm, 比色杯光径 1cm 下的理论 K 值, 其中 NADH340nm 处的毫摩尔消光系数取 6.22, 建议各实验室根据实测 K 值计算。

[0062] 表 3、蒜汁作防腐剂的试剂盒测定数据与叠氮钠作防腐剂的试剂盒测定数据对比表。

[0063]

标本号	蒜汁作防腐剂测定结果	叠氮钠作防腐剂测定结果
1	21	16

标本号	蒜汁作防腐剂测定结果	叠氮钠作防腐剂测定结果
2	56	42
3	68	55
4	12	8
5	15	10
6	58	49
7	505	380
8	118	98
9	197	159
10	314	268
11	1394	1025
12	37	33
13	61	49
14	89	75
15	76	62
16	22	15
17	56	41
18	31	22
19	22	16
20	70	57

[0064] 通过表 3 的两组测定结果进行比较,显示用蒜汁作防腐剂的试剂盒的测定结果明显比用叠氮钠作防腐剂的试剂盒的测定结果高 15% -30%,因此,进一步说明了蒜汁中的磷酸吡哆醛对测定血清的丙氨酸氨基转移酶有预活化作用,使测定的结果与患者病情的发展同步。

专利名称(译)	一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂		
公开(公告)号	CN101849559A	公开(公告)日	2010-10-06
申请号	CN201010181510.5	申请日	2010-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	浙江康特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江康特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江康特生物科技有限公司		
[标]发明人	尹鹏 安东辉		
发明人	尹鹏 安东辉		
IPC分类号	A01N65/42 A01P1/00 G01N33/53 C12Q1/52		
代理人(译)	张建青		
其他公开文献	CN101849559B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

目前的生物防腐剂可替代硫汞撒、叠氮化钠和庆大霉素等物质，效果理想，但因其价格昂贵，现在只少量用于临床研究。本发明提供了一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂，其特征在于所述的防腐剂采用蒜汁，其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的0.5%-6.0%。本发明首次采用蒜汁作为体外诊断试剂盒防腐剂，不仅对试剂盒能够进行有效的防腐、稳定，同时，蒜汁中富含的氨基酸对免疫透射比浊类试剂盒抗体液起到一定的加速反应的作用，是免疫试剂盒中抗体液的保护剂，使测定结果准确。

试剂盒性能 蒜汁用量	空白吸光度值	分析灵敏度 (mg/L)	准确度 (质控偏差)	批内精密度	线性范围 (1-130mg/L 范围内，相关系数 r 应不小于 0.9900)
0.5%	0.026	0.56	3.6%	3.2%	0.9989
1.0%	0.028	0.66	4.2%	3.4%	0.9999
1.5%	0.026	0.58	3.7%	3.3%	0.9998
2.5%	0.025	0.62	4.0%	3.4%	0.9996
3.0%	0.027	0.72	3.8%	3.5%	0.9997
3.5%	0.029	0.66	4.5%	3.7%	0.9999
4.0%	0.025	0.88	5.1%	4.0%	0.9996
4.5%	0.027	0.93	6.2%	4.7%	0.9989
5.0%	0.026	0.99	6.6%	5.2%	0.9987
5.5%	0.025	0.63	7.3%	5.4%	0.9997
6.0%	0.028	0.72	8.5%	5.8%	0.9999
可接受范围	≤0.05	≤1mg/L	±10%	≤6%	0.9900