

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380109195.3

[51] Int. Cl.

C12Q 1/60 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年8月6日

[11] 授权公告号 CN 100408691C

[22] 申请日 2003.11.26

[21] 申请号 200380109195.3

[30] 优先权

[32] 2002.11.27 [33] JP [31] 343979/2002

[32] 2002.11.28 [33] JP [31] 346115/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/015080 2003.11.26

[87] 国际公布 WO2004/048605 日 2004.6.10

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.25

[73] 专利权人 第一化学药品株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 山本祥子 山本光章 中西一夫

斋藤和典

[56] 参考文献

WO9910526A1 1999.3.4

US6479249B2 2002.11.12

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 沙永生

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 4 页

[54] 发明名称

特定脂蛋白中的脂质测定法

[57] 摘要

本发明涉及特定脂蛋白中的脂质测定法，涉及其特征不在于，至少在确定目标脂质测定的特异性的工序中使用多环类聚氧化烯衍生物的特定脂蛋白中的脂质测定法。

1. 特定脂蛋白中的脂质测定法，其特征在于，在特定脂蛋白中的脂质测定法，至少在确定目标脂质测定的特异性的工序中使用多环类聚氧化烯衍生物，其中目标脂质是 HDL 中的胆固醇，多环类聚氧化烯衍生物是优先作用于 HDL 的 HLB 14.1~18 的非离子性表面活性剂。

2. 根据权利要求 1 所述的测定法，其特征在于，多环类聚氧化烯衍生物是有 2 个以上的芳基的非离子性表面活性剂。

3. 根据权利要求 1 所述的测定法，其特征在于，多环类聚氧化烯衍生物是在苯基上具有选自苯基、萘基、烷基苯基、苯基烷基以及苯乙烯基中的 1~5 个取代的多环基的聚氧化烯醚类非离子性表面活性剂。

4. 根据权利要求 1 所述的测定法，其特征在于，测定体系包括确定目标脂质测定的特异性的工序和测定目标脂质的工序。

5. 根据权利要求 4 所述的测定法，其特征在于，测定目标脂质的工序是在控制作用于特定脂蛋白的表面活性剂和目标脂质测定试剂的反应的成分的存在下进行的。

6. 特定脂蛋白中的脂质测定试剂，其特征在于，含有作用于特定脂蛋白的多环类聚氧化烯衍生物以及测定目标脂质的试剂，其中目标脂质是 HDL 中的胆固醇，多环类聚氧化烯衍生物是特异地作用于 HDL 的 HLB 14.1~18 的非离子性表面活性剂。

7. 根据权利要求 6 所述的测定试剂，其特征在于，多环类聚氧化烯衍生物是具有 2 个以上的芳基的非离子性表面活性剂。

8. 根据权利要求 6 所述的测定试剂，其特征在于，多环类聚氧化烯衍生物是在苯基上有选自苯基、萘基、烷基苯基、苯基烷基以及苯乙烯基中的 1~5 个取代的多环基的聚氧化烯醚类非离子性表面活性剂。

特定脂蛋白中的脂质测定法

技术领域

本发明涉及用小量试样、经简便的操作、高效地分离定量存在于特定部位的脂质的方法和试剂。

背景技术

胆固醇、中性脂肪、磷脂，在血浆中结合于脱辅基蛋白质，形成脂蛋白。脂蛋白根据物理性质的不同，可分类为乳糜微粒、极低密度脂蛋白（VLDL）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）等。LDL有时再细分为中密度脂蛋白（IDL）和 LDL，而脂蛋白的分解产物（remnant）有时也作为一种脂蛋白处理。已知这些脂蛋白中 LDL 是引起动脉硬化的病因物质，而 HDL 显示抗动脉硬化作用。

流行病学上，已知 LDL 中的脱辅基蛋白质和胆固醇值与动脉硬化性疾病的发病频度呈正相关，而 HDL 中的脱辅基蛋白质和胆固醇值与动脉硬化性疾病的发病频度呈负相关。目前为预防和诊断缺血性心脏病，要进行 LDL 中和 HDL 中脱辅基蛋白质和胆固醇的测定。

作为 LDL 和 HDL 中脂质的测定法，已知有例如经超速离心分离使 LDL 和 HDL 与其他脱辅基蛋白质分离后，供各脂质测定的方法；经电泳分离后进行脂质染色，测定其发色强度的方法。然而这些方法操作均复杂，不能处理大量的样品，日常几乎不用。

脂蛋白中的脂质测量最一般的测定法，是 HDL 中胆固醇的测定法。作为 HDL 胆固醇测定方法，用于临床检查领域的方法，有在样品中加沉淀剂，使 HDL 以外的脂蛋白凝集，经离心分离将其除去，测定仅含分离的 HDL 的上清液中的胆固醇的沉淀法。该法需要较多数量的样品，整个分析工序不能完全自动化。近年也探讨用酶分别定量 HDL 胆固醇的方法。例如在胆汁酸盐和非离子性表面活性剂存在下进行酶反应的方法（日本特许公开公报昭 63-126498

号），先使 HDL 以外的脱辅基蛋白质凝集，仅使 HDL 中的胆固醇发生酶反应后，在使酶失活的同时使凝聚物再溶解而测定吸光度的方法（日本特许公开公报平 6-242110 号），组合使用使 HDL 以外的脂蛋白沉淀的沉淀试剂和胆固醇测定试剂，测定不沉淀的 HDL 中的胆固醇的方法（日本特许公报 2600065 号），使用抗体的方法（日本特许公开公报平 9-96637 号），使用糖化合物的方法（日本特许公开公报平 7-301636 号），在第一反应中，在特殊的表面活性剂的存在下使胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶作用于 HDL 以外的脂蛋白，在优先作用于其中所含的胆固醇之后，在抑制对 HDL 以外的胆固醇的的同时测定 HDL 中的胆固醇的方法（日本特许公开公报平 9-299 号），使用特定的表面活性剂和胆固醇测定用酶试剂，在 HDL 中的胆固醇与胆固醇测定用酶试剂优先反应的时间内进行测定的方法（日本特许公开公报平 11-56395 号），使胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶与特异地作用于 HDL 中的胆固醇的表面活性剂组合的方法（日本特许公开公报 2001-103998 号）。

在 HDL 胆固醇之后测定的 LDL 胆固醇测定法，通过大规模流行病学研究广泛了解了临床意义，但尚未开发出 HDL 胆固醇测定中的沉淀法这样的方法，因此利用换算法（Freidewald 法，以下简称 F 式法）。它求出根据超速离心分离法的结果设计的“推定值”。F 式法从总胆固醇减去 HDL 胆固醇和 VLDL 胆固醇算出 LDL 胆固醇，使用中性脂肪浓度的 1/5 的值作为 VLDL 胆固醇。由于是从中性脂肪推定 VLDL 胆固醇，中性脂肪浓度超过 400mg/dl 的人和 III 型高脂血症患者不能使用，而且因用餐使中性脂肪一过性地增加时，也有产生负面影响的问题。为此也开发了 LDL 胆固醇的酶测定法，有从含 LDL 胆固醇的样品消除 HDL 胆固醇之后，测定残存的 LDL 胆固醇的方法（日本特许再公开公报平 8-828734 号），在糖化合物及/或蛋白增溶剂的存在下测定样品中的 LDL 胆固醇的方法（日本特许再公开公报平 8-829599 号）。也有使用有特定结构的表面活性剂的方法（日本特许公开公报平 9-313200 号）和在含胺的缓冲液中使用作用于 LDL 以外的表面活性剂的方法（日本特许公开公报 10-38888 号）。

中性脂肪由于在血浆中多数存在于 VLDL 中，在用上述 F 式法推定 LDL 胆固醇时，被用于推定 VLDL 胆固醇值（VLDL 胆固醇 = TG/5）。中性脂肪的测定，一般使用以下方法：在第一反应中消耗游离甘油后，在第二反应中用脂

蛋白脂肪酶生成的游离甘油被磷酸化，再让甘油磷酸氧化酶与其作用，使生成的过氧化氢与过氧化物酶、4-氨基安替比林、Trinder 色素反应使之发色的方法。游离甘油的消耗使用所谓的无色发色法，过氧化物酶及其底物之一和过氧化氢酶，以及它们的组合被广泛使用。特定脂蛋白中的中性脂肪测定，已知以前使用超速离心分离法和凝集剂的分离法、使用凝胶过滤的分离法等，还有使用抑制特定脂蛋白以外的脂蛋白的反应的表面活性剂和 HLB 15 以上的表面活性剂的方法（国际专利公开号 00/43537）。

发明内容

然而，以前使用的添加剂，在对特定脂蛋白的特异性以及对用于脂质测定的酶活性的影响等方面不能充分满足。而为了探索适合条件的添加剂，必须用超速离心分离装置等昂贵的仪器，从新鲜的人血液中至少分离调制主要的脂蛋白 HDL、LDL、VLDL，分别进行评价、挑选，要化很多时间和经费。

因此本发明的目的在于提供操作简便、高效、适于各种自动分析装置的特定部位中的脂质测定法。

于是，本发明者进行深入研究的结果，发现至少在确定目标脂质测定的特异性的工序中使用特定的表面活性剂，能特异地测定样品中测定对象脂蛋白中的脂质，而且这些表面活性剂具有共同的结构特征。

即本发明提供了特定脂蛋白中的脂质测定法，其特征在于，在特定脂蛋白中的脂质测定法中，至少在确定目标脂质测定的特异性的工序中使用多环类聚氧化烯（polyoxyalkylene）衍生物。

本发明还提供了特定脂蛋白中的脂质测定试剂，其特征在于，含有作用于特定脂蛋白的多环类聚氧化烯衍生物及目标脂质测定试剂。

根据本发明，可从许多表面活性剂中选择高效有用的表面活性剂，使用它进行特定部位中脂质的定量，不必进行离心分离等前处理，操作简便，而且高效。并且用小量试样可经简便的操作进行特异的测定，适用于各种分析方法，在临床检查领域也极为有用。

附图说明

图 1 是表示本发明方法与以前的方法（使用 Cholestest N LDL）的相关

性的图。

图 2 是表示本发明方法与以前的方法（使用 Cholestest LDL）的相关性的图。

图 3 是表示本发明方法与以前的方法（使用 Cholestest N HDL）的相关性的图。

图 4 是表示本发明方法与以前的方法（使用 Cholestest LDL）的相关性的图。

图 5 是表示本发明方法测定 LDL 中性脂肪的结果的图。

图 6 是表示本发明方法测定 HDL 中性脂肪的结果的图。

图 7 是表示与本发明的表面活性剂的 HLB 的相关系数的关系的图。

图 8 是表示与本发明的表面活性剂的芳基数目的相关系数的关系的图。

具体实施方式

本发明所用的多环类聚氧化烯衍生物，可列举多环类即有 2 个以上芳基的非离子性或阴离子性表面活性剂。该芳基可列举苯基、萘基、烷基苯基、苯基烷基、苯基链烯基等。烷基苯基可列举壬基苯基等 $C_1 \sim C_{20}$ 烷基苯基。苯基烷基可列举苄基等苯基- $C_1 \sim C_6$ 烷基。苯基链烯基可列举苯乙烯基等苯基 $C_2 \sim C_6$ 烷基。这些芳基的数目较好是 2~10，特别好是 2~8。但缩合物的场合不受此限制。

多环类基团的较好例子是苯基上有 1~5 个，较好有 1-3 个选自苯基、萘基、烷基苯基、苯基烷基和苯乙烯基中的芳基取代的基。

该表面活性剂的聚氧化烯基，可列举聚氧化乙烯基、聚氧化乙烯聚氧丙烯基、聚氧丙烯基等，特别好是聚氧乙烯基。聚氧化烯加成摩尔数，随测定对象的目标脂质、聚氧化烯基的种类而异，较好是 2~100，更好是 5~10，特别好是 10~50。

多环类聚氧化烯衍生物中，作为非离子性表面活性剂，较好是聚氧化烯醚类非离子性表面活性剂。并且非离子性表面活性剂的场合，其 HLB 较好是 12~18。作为阴离子性表面活性剂，较好是磺酸酯类、磷酸酯类或磺基琥珀酸酯类阴离子性表面活性剂。

在目标脂质是胆固醇的场合，作为多环类聚氧化烯衍生物，是作用于特定的脂蛋白的 HLB 12~18 的非离子性表面活性剂，较好是使用对目标脂质的特异性不依赖于该表面活性剂的 HLB 的、专门受芳基数目支配的表面活性剂。

在目标脂质是胆固醇的场合，作为多环类聚氧化烯衍生物，是作用于特定的脂蛋白的 HLB 12~18 的非离子性表面活性剂，较好是使用有 2 个以上的芳基的表面活性剂（但除外测定 LDL 中的胆固醇时测定特异性受缓冲液影响的 HLB 13~15 的表面活性剂）。

此外，在目标脂质是 HDL 中的胆固醇的场合，作为多环类聚氧化烯衍生物，较好是使用优先作用于 HDL 的 HLB 14.1~18、特别好是 HLB 14.3~18 的非离子性表面活性剂。而在目标脂质是 LDL 中的胆固醇的场合，作为多环类聚氧化烯衍生物，较好是使用优先作用于 LDL 以外的 HLB 15.1~18、特别好是 HLB 15.3~18 的非离子性表面活性剂。而在目标脂质是特定脂蛋白中的中性脂肪的场合，作为多环类聚氧化烯衍生物，较好是使用优先作用于 LDL 以外的 HLB 为 12~18 的有 2 个以上芳基的非离子性表面活性剂。在目标脂质是 LDL 中的中性脂肪的场合，多环类聚氧化烯衍生物，较好是使用优先作用于 LDL 以外的 HLB 为 12~15 的有 2 个以上芳基的非离子性表面活性剂。这里的优先作用，是指对特定脂蛋白的作用优先于其他脂蛋白。

特别好的聚氧化烯衍生物，可例举有多个苯基的聚氧化烯多环苯基醚、聚氧化烯三苄基苯基醚、聚氧化烯多苯乙烯基苯基醚、聚氧化烯苯基苯酚醚、聚氧化烯多苯乙烯基苯基醚缩合物、聚氧化烯烷基苯基醚缩合物、聚氧化烯二苯乙烯化苯基醚、聚氧化烯苯乙烯化苯基醚、聚氧化烯烯丙基苯基醚、聚氧化烯多环苯基磺基琥珀酸酯等。

这些聚氧化烯衍生物的市售品，有聚氧化烯多环苯基醚 Pegnol 005 (HLB14.6,东邦化学工业公司制); Newcol 610 (HLB 13.8)、Newcol 710 (HLB 13.6)、Newcol 710F (HLB 13.5)、Newcol 714 (HLB 15.0)、Newcol 714F (HLB 14.4)、Newcol 740 (HLB 17.9)、Newcol 2600FB (HLB 13.4)、Newcol 2608F (HLB 13.0)、Newcol 2609 (HLB 13.0)、(以上日本乳化剂公司制); 聚氧化烯多苯乙烯基苯基醚 Pionin D-6112W(HLB13.0)、Pionin D-6115× (HLB 14.5)、Pionin D-6115Z(HLB15.5) (以上，竹本油脂公司制); 聚氧化烯苯基

苯酚醚 Sorpol T-15 (HLB 12.0)、Sorpol T-20 (HLB13.3)、Sorpol T-26(HLB14.4) (以上东邦化学工业公司制); 聚氧化烯多苯乙烯基苯基醚缩合物 Pionin D-6320(HLB 13.0)(竹本油脂公司制); 聚氧化烯烷基苯基醚缩合物 Pionin D-640(HLB14.3) (竹本油脂公司制)、R-1020(HLB 18.0) (日光化学公司); 聚氧化烯二苯乙烯化苯基醚 Emulgen A-90(HLB 14.5) (花王公司制); 聚氧化烯苯乙烯化苯基醚 Sanmol 2SP-180(HLB 14.5)(日华化学公司制); TSP-16(HLB 12.7)(青木油脂公司制); 聚氧化烯烯丙基苯基醚 New Kalgen FS-12(HLB13) (竹本油脂公司制); 聚氧化烯多环苯基磺基琥珀酸酯 Airrol T-1500(东邦化学工业公司制)等。

这些多环类聚氧化烯衍生物可单独、混合或与其他表面活性剂组合使用。本发明的多环类聚氧化烯衍生物可以是多个多环类聚氧化烯衍生物的混合物。例如有苜基的苯基醚, 可以是单苜基、二苜基、三苜基的形态单独或混合。有苯乙烯基的苯基醚, 可以是单苯乙烯基、二苯乙烯基、三苯乙烯基的形态单独或混合。各形态的混合比没有特别限制, 较好是单取代物 1~20%、二取代物 10~40%、三取代物 40~90%, 更好是单取代物 2~15%、二取代物 10~40%, 三取代物 50~90%。这些混合的市售品的例子有 Pegnol 005 (大致的混合比的平均值, 单取代物为 7%, 二取代物 20%, 三取代物 73%), 其各成分的用量随化合物而异, 没有特别限制, 为 0.0001 质量%~10 质量% (以下简称%), 较好使用 0.001%~5%。本发明的多环类聚氧化烯衍生物可至少用于确定目标脂质测定的特异性的工序。

本发明是测定特定脂蛋白中的目标脂质的方法及其试剂, 特定脂蛋白包括 HDL、LDL、IDL、VLDL、乳糜微粒及其分解物。目标脂质包括胆固醇、中性脂肪、磷脂。因此测定对象可列举 HDL 中的胆固醇、LDL 中的胆固醇、VLDL 中的胆固醇、IDL 中的胆固醇、乳糜微粒中的胆固醇、它们的分解物中的胆固醇、HDL 中的中性脂肪、LDL 中的中性脂肪、VLDL 中的中性脂肪、IDL 中的中性脂肪、乳糜微粒中的中性脂肪、它们的分解物中的中性脂肪、HDL 中的磷脂、LDL 中的磷脂、VLDL 中的磷脂、IDL 中的磷脂、乳糜微粒中的磷脂、它们的分解物中的磷脂。它们的大多数与动脉硬化性疾病有深刻的关联, 迫切要求分离定量。

本发明的方法包括测定目标脂质的工序以及确定目标脂质测定的特异性的工序，但确定目标脂质测定的特异性的工序可与测定目标脂质的工序分开进行，也可以同时进行。而这些工序并不表示试剂等分阶段使用，较好是在一个体系中进行这些工序。作为确定目标脂质测定的特异性的工序，可列举对特定脂蛋白以外的脂蛋白进行前处理的工序、用测定所用的酶与来自预先经前处理的反应液中的目标脂蛋白中的目标脂质反应的工序等。测定目标脂质的工序，使用测定目标脂质的试剂，这些试剂包括从脂蛋白游离目标脂质的酶，例如酯分解酶。

作为样品，可使用包括人在内的动物特别是哺乳类的体液、机体成分，较好是全血、血清、血浆、脑脊液、汗、尿、泪液、唾液、皮肤、粘膜，特别好是血清、血浆。样品可直接使用，也可经稀释，或者经过分离装置分离，也可经过干燥。

特定脂蛋白以外的脂蛋白，例如在目标脂质是 HDL 中的脂质的场合是 HDL 以外的脂蛋白，即 LDL、VLDL、IDL、乳糜微粒和它们的分解物，在目标脂蛋白是 LDL 的场合是 HDL、VLDL、IDL、乳糜微粒以及它们的分解物。本发明的表面活性剂，与对特定脂蛋白具有高亲和性的场合相反，有时对特定脂蛋白具有比其他脂蛋白低的亲和性，可根据目标脂质分别使用。

本发明中用于目标脂质测定的试剂酯分解酶，是用于测定构成脂蛋白的脂质的酶，例如胆固醇酯酶、脂蛋白脂肪酶、磷脂脂肪酶等使酯键分解的酶都可以，它们可以来自微生物、来自动物、来自植物，也可以基因操作而制得。也不管有否经化学改性。它们可以为溶液状态或干燥状态，可载持或结合于不溶性载体。

这些酶根据需要，可组合使用用于目标脂质测定的其他酶、辅酶、发色剂。作为其他酶可使用胆固醇脱氢酶、胆固醇氧化酶、甘油磷酸化酶、甘油磷酸氧化酶、甘油磷酸脱氢酶、甘油脱氢酶、丙酮酸磷氧化酶、乳酸脱氢酶、胆碱氧化酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、心肌黄酶等。它们可来自微生物、来自动物、来自植物，也可经基因操作制得。也不管有否经化学改性。它们可以为溶液状态或干燥状态，可载体或结合于不溶性载体。作为辅酶可使用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）、

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH)、硫代 NAD、硫代 NADP 等, 作为发色剂只要经 POD 和心肌黄酶作用形成色素的都可以, 可使用 4-氨基安替比林、Trinder 色素类、甲臍色素类等。这些酶可单独或 2 种以上组合使用, 其用量根据酶而不同, 没有特别限制, 可为 0.001 单位~1000 单位/mL, 较好使用 0.1 单位~1000 单位/mL。本发明中 2 个工序可分别实施, 也可用同一试剂实施。

本发明的含酶的试剂中可在不损害测定的特异性的条件下, 为调节酶的作用而配合其他酶、盐、用于调节 pH 的缓冲剂、表面活性剂类、防腐剂、白蛋白等蛋白质类、抗生素、皂角苷、凝集素、聚阴离子类 (磷钨酸的盐、硫酸葡聚糖、聚乙烯硫酸酯、硫酸化环糊精等)、2 价金属的盐、聚乙二醇类、对磷脂等特定的脂蛋白具有亲和性的试剂、防腐剂和作为过氧化氢酶抑制剂的叠氮化物的盐。其中聚阴离子类或 2 价金属的盐是控制目标脂质测定试剂的反应的成分, 可与作用于特定脂蛋白的表面活性剂多环类聚氧化烯衍生物合同。

作为缓冲剂, “GOOD” 缓冲剂、磷酸、トリス、邻苯二甲酸、柠檬酸盐等通常可用于 pH5~9 的范围的缓冲液以及在此范围内有缓冲作用的缓冲剂都可以使用。其用量没有特别限制, 较好是 0.005M~2M。特别好是 0.01~1M。本发明所用的多环类聚氧化烯衍生物, 例如其反应性并不依赖于缓冲液。反应温度, 上述 2 个工序可相同也可不同, 较好是本发明的试剂处于溶液状态的温度, 例如 10~40℃。

与多环类聚氧化烯衍生物合用的表面活性剂, 例如在已用多环类聚氧化烯衍生物对目标以外的脂蛋白中的脂质进行前处理后用于测定目标脂质的表面活性剂、在不损害测定的特异性的情况调节酶的作用、控制目标脂质测定试剂的反应的表面活性剂等。它们不需要用于确定特异性的工序的上述多环类聚氧化烯衍生物那样的特异性。作为这些表面活性剂, 可使用没有芳基的表面活性剂、只有 1 个芳基的表面活性剂。它们可以是非离子性或离子性表面活性剂, 作为非离子性的可使用没有芳基的聚氧乙烯烷基醚类、聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、有 1 个苯基的聚氧乙烯烷基苯基醚类。作为聚氧乙烯烷基醚类可使用 Emulgen 709 (花王公司制) 等, 作为聚氧乙烯烷基苯基醚类可使用 Triton X 100 (Sigma 公司制) 等, 作为聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物类可使用 Pluronic F-108

(旭电化公司制)等。作为离子性的可使用胆汁酸类。这些表面活性剂的用量较好使其浓度成为 0.0001~5%。特别好是成为 0.001~5%。

添加这些脂质测定用的酶试剂后,最终检出目标脂质的方法没有特别限制,例如可利用再将过氧化物酶的和心肌黄酶与色原组合进行吸光度分析,直接检出辅酶和过氧化氢的方法,测定金属等的氧化还原的方法等。本发明的试剂,不仅以溶液状态提供,也以干燥状态提供、凝胶状态。各制剂可以在玻璃瓶、塑料容器之外,以涂布、含浸于各种不溶性载体,如胶乳、玻璃、胶体等粒子、球状载体、半导体和玻璃等平板状、纸和硝化纤维素等膜状载体、纤维状载体的各种形式提供。

本发明测定 HDL 或 LDL 胆固醇时,在多环类聚氧化烯衍生物的存在下,例如使胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶进行反应。也可在多环类聚氧化烯衍生物存在下对 HDL 或 LDL 以外的脂蛋白中的胆固醇进行前处理,而在下一工序中使胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶与残留的 HDL 或 LDL 反应。

在测定 HDL 或 LDL 中性脂肪时,在第一工序中对游离甘油进行前处理,在下一工序中使脂蛋白脂肪酶起作用,使一般的中性脂肪测定试剂起反应而进行测定。这些多环类聚氧化烯衍生物可用于第一工序也可用于第二工序。较好的实施方式,可列举在使游离甘油不参与反应的前处理工序和使脂蛋白脂肪酶作用于特定脂蛋白的工序组成的特定脂蛋白中的中性脂肪测定体系中,在多环类聚氧化烯衍生物存在下使脂蛋白脂肪酶与特定脂蛋白的中性脂肪反应测定特定脂蛋白中的中性脂肪的方法;以及在使游离甘油不参与反应的前处理工序和使脂蛋白脂肪酶作用于特定脂蛋白的工序组成的特定脂蛋白中的中性脂肪测定体系中,在 HLB 12~15 的多环类聚氧化烯衍生物存在下对游离甘油和特定脂蛋白以外的中性脂肪进行前处理的特定脂蛋白中的中性脂肪测定方法。在样品中游离甘油用其他途径测定的场合或者样品中的甘油与特定脂蛋白中的中性脂肪相比可以忽略的场合,游离甘油的前处理工序或其试剂也可以省略。

这些基本的工序,作为血清中 HDL 胆固醇、LDL 胆固醇、中性脂肪等的测定法已经普及。

实施例

以下列举实施例对本发明作进一步说明，但本发明并不受它们限制。

实施例中有时把多环类聚氧化烯衍生物称为本发明的表面活性剂。

实施例 1 (HDL 胆固醇的测定)

按本发明的方法，用日立 7170 型自动分析装置测定 HDL 胆固醇，将其测定值与市售的 HDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 15 例人血清作样品。本发明的试剂，是在血清 2.4 μ L 中添加含 0.01% 4-氨基安替比林、100mM PIPES 缓冲液 (pH 6.5) 的试剂 240 μ L，于 37 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟后，加入含本发明的表面活性剂 1%、1 单位/mL 胆固醇氧化酶 (Oriental 酵母)、1 单位/mL 胆固醇酯酶 (旭化成)、1 单位/mL 过氧化物酶、0.04% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、100mM PIPES 缓冲液 (pH6.5) 的试剂 80 μ L，于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 700nm/主波长 600nm 测定吸光度的变化量。使用 Cholestest N HDL(第一化学药品公司制)作为市售的 HDL 胆固醇测定试剂，按所附的使用说明测定，求出与本发明的方法的相关系数。结果示于表 1。如表 1 所示，发现本发明的方法与以前的自动分析法之间具有良好的相关性。作为对照，用有 1 个苯基的表面活性剂 (Triton \times 100) 代替本发明的表面活性剂同样进行测定。

表 1
相关系数比较

表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数
Pionin D-6112W	0.90	Newcol 610	0.88	Newcol 2608F	0.92
Pionin D-6115X	0.81	Newcol 710	0.79	Newcol 2609	0.89
Pionin D-6320	0.84	Newcol 710F	0.79	Pegmol 005	0.92
Pionin D-640	0.79	Newcol 714	0.81	EmulgenA90	0.94
New Kalgen FS-12	0.89	Newcol 714F	0.84	Airrol T-1500	0.88
Sanmol 2SP-180	0.89	Newcol 2600FB	0.92	Triton X100 (比较例)	0.68

实施例 2 (HDL 胆固醇的测定)

按本发明的方法,用日立 7170 型自动分析装置测定 HDL 胆固醇,将其测定值与市售的 HDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 15 例人血清作样品。本发明的试剂,是在血清 2.4 μ L 中加含 0.01% 4-氨基安替比林、45 μ M 毛地黄皂苷(东京化成)、100mM PIPES 缓冲液(pH6.5)的试剂 240 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟后,加入含本发明的表面活性剂 1%、1 单位/ml 胆固醇氧化酶(Oriental 酵母)、1 单位/mL 胆固醇酯酶(旭化成)、1 单位/mL 过氧化物酶、0.04 重量% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、100mM PIPES 缓冲液(pH6.5)的试剂 80 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 700nm/主波长 600nm 测定吸光度的变化量。使用 Cholestest N HDL(第一化学药品公司制)作为市售的 HDL 胆固醇测定试剂,按所附的使用说明测定,求出与本发明的方法的相关系数。结果示于表 1。如表 2 所示,发明本发明的方法与以前的自动分析法之间具有良好的相关性。作为对照,用有 1

个苯基的表面活性剂 (Triton ×100) 代替本发明的表面活性剂同样进行测定。

表 2
相关系数比较

表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数
Pionin D-6115X	0.92	ソボルール T-26	0.93	Newcol 740	0.88
Pionin D-6115Z	0.93	Newcol 714	0.94	Airrol T1500	0.98
Pionin D-640	0.91	Newcol 714F	0.95	Triton X100 (比较例)	0.67

实施例 3 (HDL 胆固醇的测定)

按本发明的方法, 用日立 7170 型自动分析装置测定 HDL 胆固醇, 将其测定值与市售的 HDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 15 例人血清作样品。本发明的试剂, 是在血清 2.4 μ L 中加含 0.01% 4-氨基安替比林、0.04% 磷钨酸钠 (キシダ)、0.2% 氯化镁、100mM PIPES 缓冲液 (pH6.5) 的试剂 240 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟后, 加入含本发明的表面活性剂 1%、1 单位/mL 胆固醇氧化酶 (Oriental 酵母)、1 单位/mL 胆固醇酯酶 (旭化成)、1 单位/mL 过氧化物酶、0.04 重量% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、100mM PIPES 缓冲液 (pH6.5) 的试剂 80 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 700nm/主波长 600nm 测定吸光度的变化量。使用 Cholestest N HDL (第一化学药品公司制) 作为市售的 HDL 胆固醇测定试剂, 按所附的使用说明测定, 求出与本发明的方法的相关系数。结果示于表 3。如表 3 所示, 发现本发明的方法与以前的自动分析法之间具有良好的相关性。作为对照用有 1 个苯基的表面活性剂 (Triton ×100) 代替本发明的表面活性剂同样进行测定。

表 3
相关系数比较

表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数
Sorpol T-15	0.90	Newcol 714	0.87	Airrol T1500	0.93
Sorpol T-20	0.84	Newcol 714F	0.88	Triton X100 (比较例)	0.73

实施例 4 (LDL 胆固醇的测定)

按本发明的方法,用日立 7170 型自动分析装置测定 LDL 胆固醇,将其测定值与市售的 LDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 15 例人血清作样品。本发明的试剂,是在血清 2.4 μ L 中加由 1 单位/mL 胆固醇氧化酶(东洋纺)、1 单位/mL 胆固醇酯酶(旭化成)、1 单位/mL 过氧化物酶、0.02% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、100mM PIPES 缓冲液(pH6.5)、本发明的表面活性剂 1%组成的第一试剂 240 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟后,加入含 0.02% 4-氨基安替比林、100mM PIPES 缓冲液(pH6.5)、1%Emulgen709 的试剂 80 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 660nm/主波长 546nm 测定吸光度的变化量。使用 Cholestest LDL(第一化学药品公司制)作为市售的 LDL 胆固醇测定试剂,按所附的使用说明测定。结果示于表 4。如表 4 所示,发现本发明的方法与以前的自动分析法之间具有良好的相关性。作为对照用有 1 个苯基的表面活性剂(Triton \times 100)代替本发明的表面活性剂同样进行测定。

表 4
相关系数比较

表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数	表面活性剂	相关系数
Pionin D-6115X	0.98	Newcol 610	0.99	Newcol 2608F	0.91
Pionin D-6115Z	0.97	Newcol 710	0.99	Pegmol 005	0.99
Pionin D-640	0.96	Newcol 710F	0.99	EmulgenA90	0.99
Sorpol T-15	0.92	Newcol 714	0.98	Airrol T-1500	0.95
Sorpol T-20	0.99	Newcol 714F	0.98	Triton X100 (比较例)	0.74
Sanmol 2SP-180	0.99	Newcol 740	0.96		

实施例 5 (HDL 胆固醇和 LDL 胆固醇的测定)

按本发明方法, 用日立 7170 型自动分析装置测定 HDL 胆固醇, 将其测定值与市售的 HDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 50 例血清作样品。本发明的试剂, 是在血清 2.4 μ L 中添加含 1 单位/mL 胆固醇氧化酶 (东洋纺)、1 单位/mL 过氧化物酶、0.02% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、0.2mM 氟灭酸 (シグマ)、50mM NaCl、50mM Bis-Tris 缓冲液 (pH6) 的试剂 240 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟后, 加入含 1 单位/mL 胆固醇酯酶 (旭化成)、1% Pegmol 005、0.02% 4-氨基安替比林、50mM Bis-Tris 缓冲液 (pH6) 的试剂 80 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 700nm/主波长 600nm 测定度的变化量。使用 Cholestest N HDL (第一化学药品公司制) 作为市售的 HDL 胆固醇测定试剂, 按所附的使用说明测定。其结果示于图 1。如图 1 所示, 发现本发明的方法与以前的自动分析法具有良好的相关关系, 相关系数 $r=0.999$ 。

接着,按本发明的方法,用日立 7170 型自动分析装置测定 LDL 胆固醇,将其测定值与市售的 LDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 50 例血清作样品。本发明的试剂,是在血清 2.4 μ L 中添加由 1 单位/mL 胆固醇氧化酶(旭化成)、1 单位/mL 胆固醇酯酶(旭化成)、1% Pegnol 005(东邦化学工业)、1 单位/mL 过氧化物酶、0.01% 4-氨基安替比林、200mL NaCl、50mM EMS 缓冲液(pH 6.5)组成的第一试剂 240 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟后,加入含 0.04% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、1% Emulgen709、50mM EMS 缓冲液(pH6.5)的试剂 80 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 660nm/主波长 546nm 测定吸光度的变化量。使用 Cholestest N HDL(第一化学药品公司制)作为市售的 LDL 胆固醇测定试剂,按所附的使用说明测定。其结果示于图 2。如图 2 所示,发现本发明的方法与以前的自动分析法具有良好的相关关系,相关系数 $r=0.999$ 。

以上结果表明本发明的表面活性剂具有可用于多种特定脂蛋白中的脂质测定的性质。

实施例 6 (HDL 胆固醇和 LDL 胆固醇的测定)

按本发明的方法,用日立 7170 型自动分析装置测定 HDL 胆固醇,将其测定值与市售的 HDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 20 例人血清作样品。本发明的试剂,是在血清 2.4 μ L 中添加含 0.01% 4-氨基安替比林、100mM PIPES 缓冲液(pH6.5)的试剂 240 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟后,加入含 1 单位/mL 胆固醇氧化酶(Oriental 酵母)、1 单位/mL 胆固醇酯酶(旭化成)、1% EmulgenA90、1 单位/mL 过氧化物酶、0.04% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、100mM PEPES 缓冲液(pH6.5)的试剂 80 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 700nm/主波长 600nm 测定吸光度的变化量。使用 Cholestest N HDL(第一化学药品公司制)作为市售的 HDL 胆固醇测定试剂,按所附的使用说明测定。其结果示于图 3。如图 3 所示,发现本发明的方法与以前的自动分析法具有良好的相关关系。相关系数 $r=0.952$ 。

接着,按本发明的方法,用日立 7170 型自动分析装置测定 LDL 胆固醇,将其测定值与市售的 LDL 胆固醇测定试剂的测定值进行比较。用 20 例人血清作样品。本发明的试剂,是在血清 2.4 μ L 中添加由 1 单位/mL 胆固醇氧化酶(东

洋纺)、1单位/mL胆固醇酯酶(旭化成)、1单位/mL过氧化物酶、0.02% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、100mM PIPES缓冲液(pH6.5)、1% EmulgenA90组成的第一试剂240 μ L,于37 $^{\circ}$ C保温10分钟后,加入含0.02% 4-氨基安替比林、100mM PIPES缓冲液(pH6.5)、1% Emulgen709的试剂80 μ L,于37 $^{\circ}$ C在副波长660nm/主波长546nm测定吸光度的变化量。使用Cholestest N HDL(第一化学药品公司制)作为市售的HDL胆固醇测定试剂,按所附的使用说明测定。其结果示于图4。如图4所示,发现本发明的方法与以前的自动分析法具有良好的相关关系。相关系数 $r=0.987$ 。

以上结果,表明本发明的表面活性剂具有可用于多种特定脂质中的脂质测定的性质。

实施例7(LDL胆固醇的测定)

用各种缓冲液配制本发明方法的LDL胆固醇试剂,将其测定值进行比较。测定用日立7170型自动分析装置,用人血清15例作样品。本发明的试剂,是在血清2.4 μ L中加由含1单位/mL胆固醇氧化酶(东洋纺)、1单位/mL胆固醇酯酶(旭化成)、1单位/mL过氧化物酶、0.02% N,N-二磺基丁基间甲苯胺、1% Pegnol 005的100mM各种缓冲液组成的第一试剂240 μ L,于37 $^{\circ}$ C保温5分钟后,加入含0.02% 4-氨基安替比林、1% Emulgen709、100mM各种缓冲液的试剂80 μ L,于37 $^{\circ}$ C在副波长660nm/主波长546nm测定吸光度的变化量。使用Cholestest N HDL(第一化学药品公司制)作为市售的LDL胆固醇测定试剂,按所附的使用说明测定。其结果示于图5。如图5所示,发现本发明的方法与以前的自动分析法具有良好的相关关系。且不随缓冲液的种类而变化。

表 5
相关系数比较

缓冲液 (pH)	相关系数	缓冲液 (pH)	相关系数
PIPES (6.5)	0.998	马来酸 (6.5)	0.998
MES (6.5)	0.997	邻苯二甲酸 (6.0)	0.996
磷酸 (6.5)	0.997		

实施例 8 (LDL 中性脂肪的测定)

以血清作样品，经超速离心分离法分离各脂蛋白部位，测定各部位中的总胆固醇，标绘于图 5。再按本发明的方法，测定同一样品的中性脂肪，标绘于图 5。测定用日立 7150 型自动分析装置进行，总胆固醇测定使用ピニアオート ST-CHO(第一化学药品制)。本发明的 LDL 中性脂肪测定试剂，是在血清 3 μ L 中加由 0.5 单位/mL 甘油激酶(旭化成)、3 单位/mL 甘油-3-磷酸氧化酶(东洋纺)、1.5 单位/mL 过氧化物酶(东洋纺)、1 单位/mL LPL(东洋纺)、1% Pegnol 005(东邦化学工业)、3mM 氯化镁、0.5mM 氯化钙、2.5mM ATP、0.02% 乙基磺基丁基间甲苯胺、50mM MES 缓冲液 (pH6.3) 组成的第一试剂 300 μ L，于 37 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟后，加含 0.01% 4-氨基安替比林、1% Emulgen709、50mM MES 缓冲液 (pH6.3) 的试剂 100 μ L，于 37 $^{\circ}$ C 在副波长 700nm/主波长 546nm 测定吸光度的变化量。如图 5 所示，本发明的方法能特异地测定 LDL 中的 TG。

实施例 9 (HDL 中性脂肪的测定)

以血清作样品，经超速离心分离法分离各脂蛋白部位，测定各部位中的总中性脂肪，标绘于图 6。再按本发明的方法，测定同一样品的中性脂肪，标绘于图 6。测定用日立 7170 型自动分析装置进行，总中性脂肪测定使用ピニアオート S TG-N(第一化学药品制)。本发明的 HDL 中性脂肪测定试剂，是在血清 2.8 μ L 中加由 3 单位/mL 甘油激酶(旭化成)、3 单位/mL 甘油-3-磷酸氧化酶(东洋纺)、500 单位/mL 过氧化氢酶、3mM 氯化镁、3mM ATP、2mM 乙基磺基丁基间甲苯胺、100mM PIPES 缓冲液 (pH7) 组成的第一试剂 210 μ L，

于 37℃ 保温 5 分钟后，加入含 500 单位/mL 脂肪酶（旭化成）、1 单位/mL 甘油单酯脂肪酶（旭化成）、10 单位/mL 过氧化物酶（东洋纺）、1.5% Pegnol 005（东邦化学工业）、0.04% 4-氨基安替比林、1mM 氯化钙、100mM PIPES 缓冲液（pH7）的试剂 70 μ L，于 37℃ 在副波长 700nm/主波长 546nm 测定吸光度的变化量。如图 6 所示，本发明的方法能特异地测定 HDL 中的 TG。

实施例 10 (表面活性剂的 HLB 与相关系数的关系)

本发明的表面活性剂，HLB 值虽没有特别重要的意义，但较好定为 12 以上。图 7 显示本发明的实施例 1 至实施例 4 所示的相关系数与本发明的表面活性剂的 HLB 的关系。图 7 表示本发明的表面活性剂的 HLB 值与相关系数的关系未见一定的倾向。

实施例 11 (表面活性剂的芳基数与相关系数的关系)

本发明的表面活性剂，以具有 2 个以上的芳基作为特征之一（表 6）。图 8 表示本发明的实施例 1 至实施例 4 所示的相关系数与本发明的表面活性剂的芳基数目的关系。本发明的表面活性剂中的缩合物类不包括在内。图 8 表明表面活性剂的芳基数在 2 个以上的场合，比只有 1 个的对照方法可得到良好的相关系数。本发明中计数芳基时，将具有作为共同的结构特征的苯环作为代表，以苯基数目表示。

表 6
本发明表面活性剂芳基数

本发明的表面活性剂		芳基数 (作为苯基的数目)
Sorpol	T-15	2
Sorpol	T-20	2
Sorpol	T-26	2
Sanmol	2SP-180	2
Newcol	610	3
Newcol	710	3
Newcol	710(F)	3
Newcol	714	3
Newcol	714F	3
Newcol	740	3
Emulgen	A90	3
Pegmol	005	4
Newcol	2608F	4
Newcol	2600FB	4
Newcol	2609	4
比较例		
Triton	X100	1

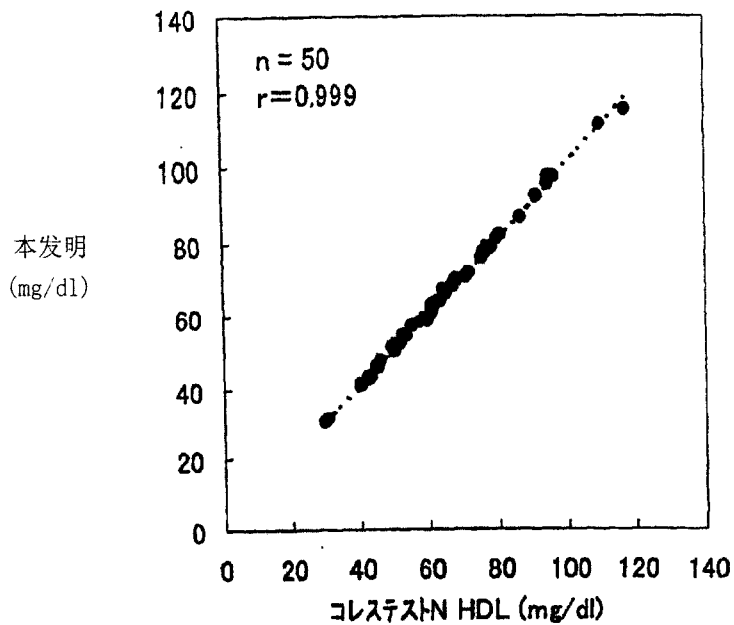


图 1

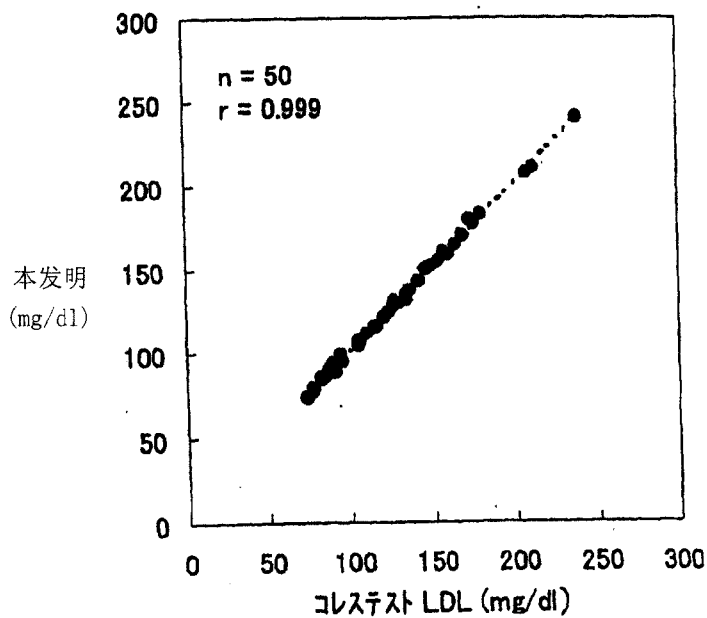


图 2

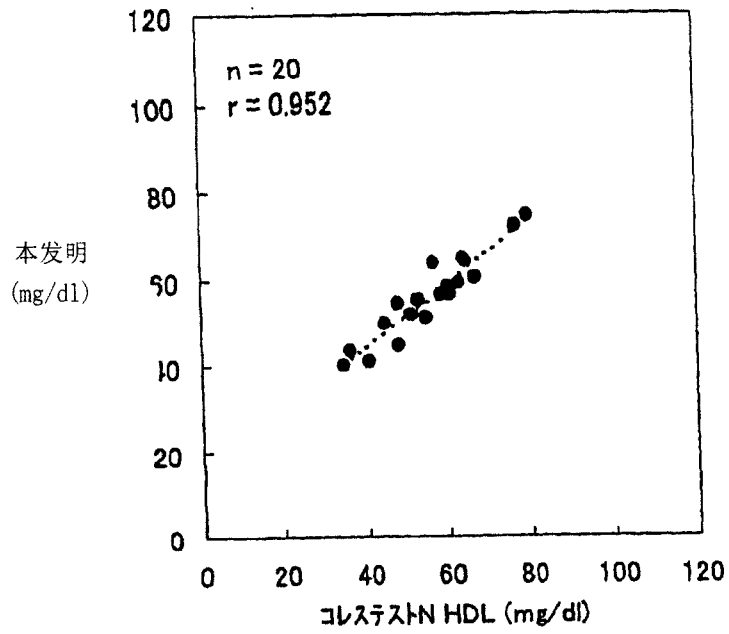


图 3

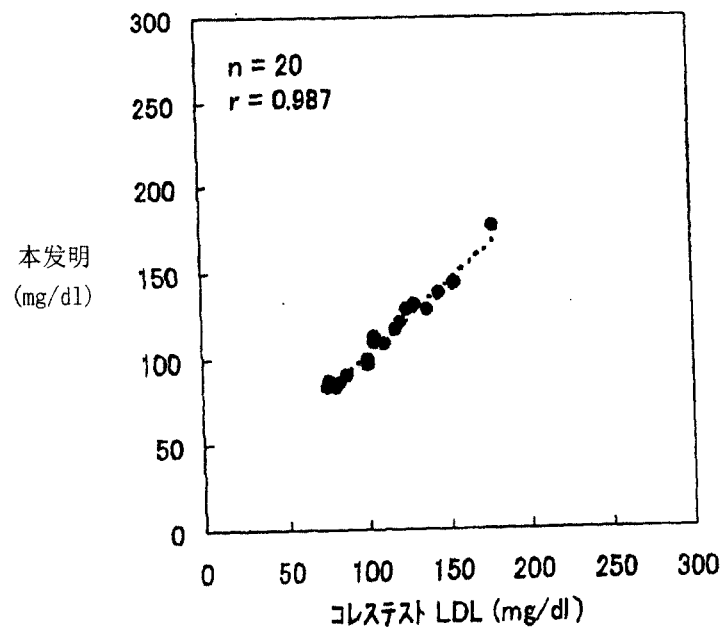


图 4

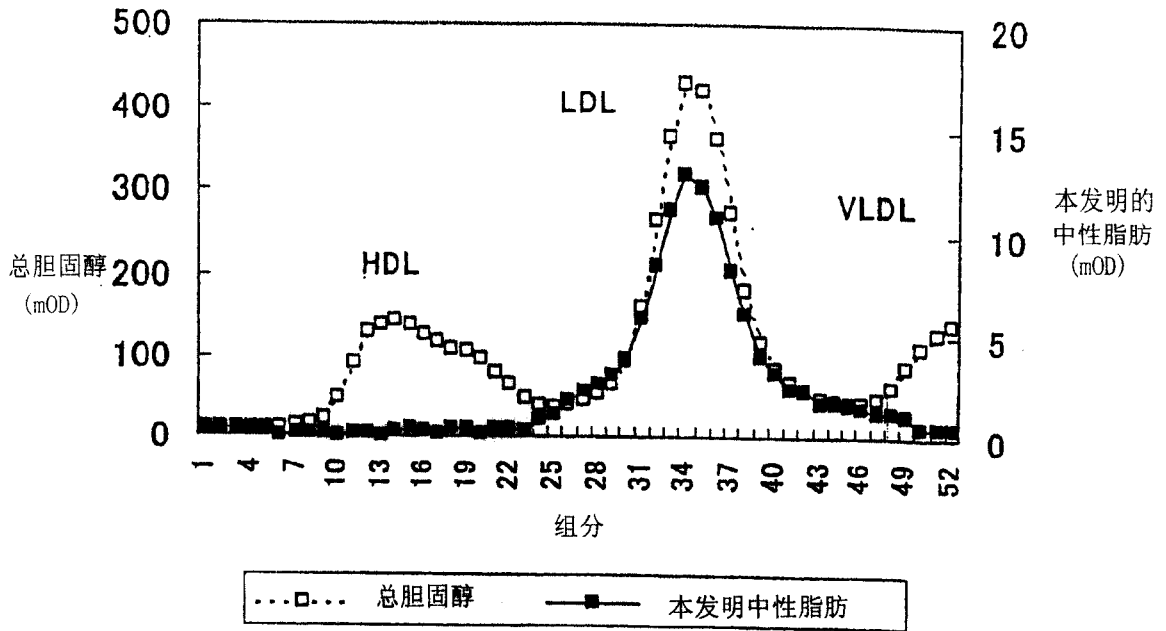


图 5

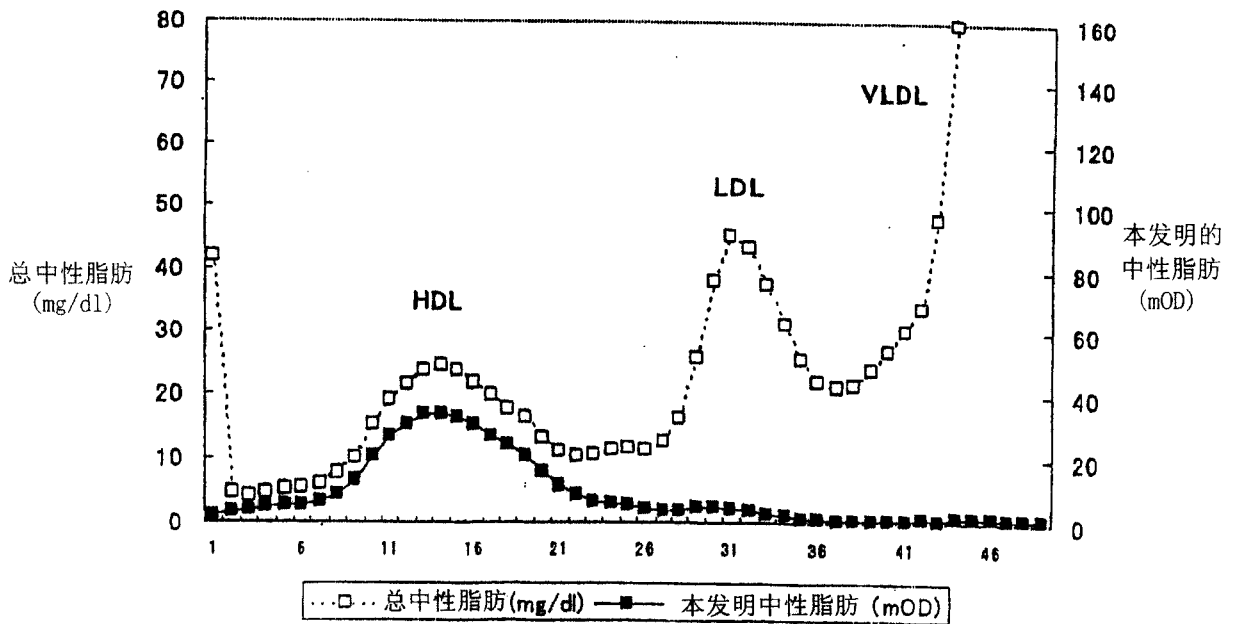


图 6

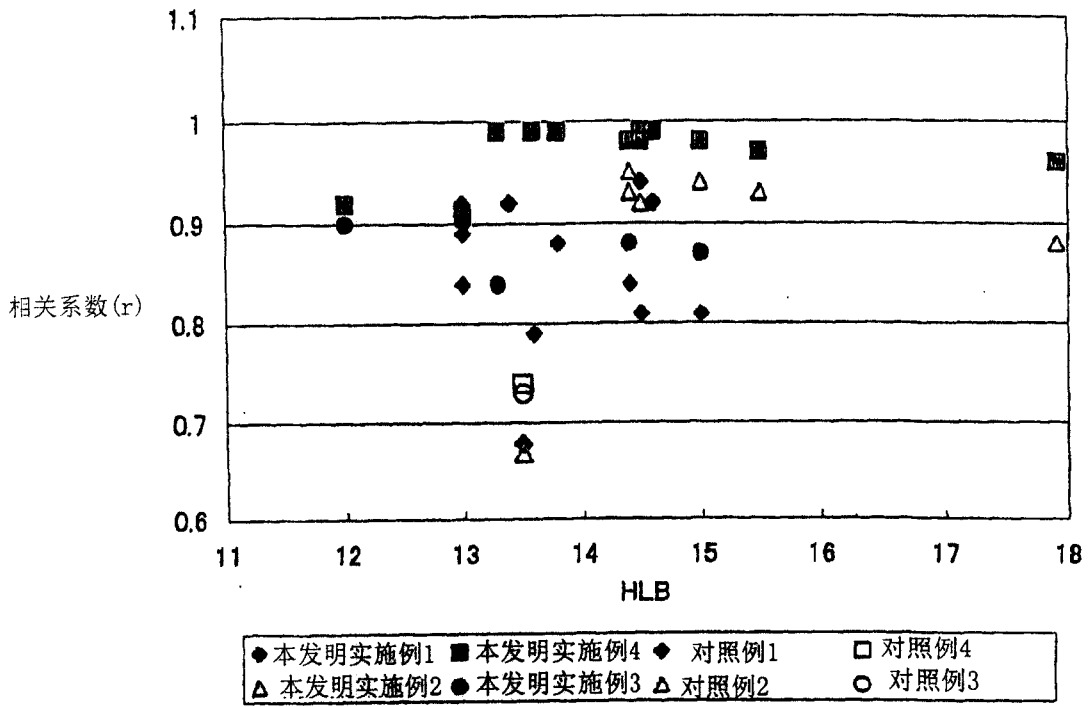


图 7

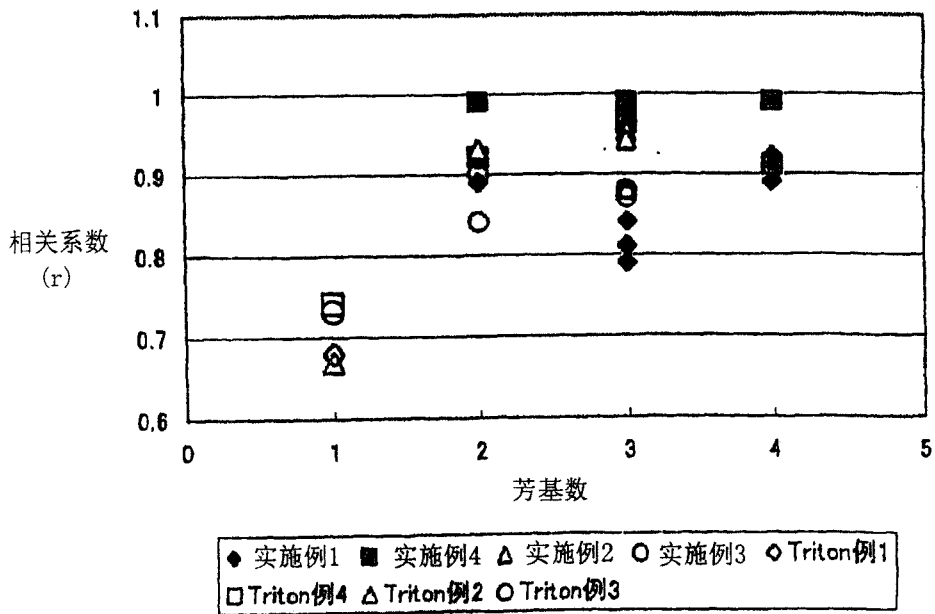


图 8