

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12Q 1/60

C12Q 1/44

C12Q 1/26

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95192343.9

[45]授权公告日 2001年10月10日

[11]授权公告号 CN 1072724C

[22]申请日 1995.4.3

[21]申请号 95192343.9

[30]优先权

[32]1995.1.31 [33]JP [31]13607/1995

[86]国际申请 PCT/JP95/00641 1995.4.3

[87]国际公布 WO96/23902 日 1996.8.8

[85]进入国家阶段日期 1996.9.28

[73]专利权人 第一化学药品株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 日野浩一 中村光浩 真锅满久

[56]参考文献

JP6242110 1994.9.2 C12Q1/26

JP63126498 1988.5.30 C12Q1/26

审查员 刘素萍

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 郭建新

权利要求书1页 说明书6页 附图页数0页

[54]发明名称 定量测定胆固醇的方法

[57]摘要

一种定量测定高密度脂蛋白中胆固醇的方法,其中,在用酶法测定胆固醇之前,向含有脂蛋白的试样中加入一种表面活性剂和一种与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白形成配合物的物质。该方法不需要象离心分离这样的任何预处理步骤。简单操作就可有效测定 HDLs 中的胆固醇。本方法同样可以用于各种自动分析仪,因而在临床测定领域中非常有用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种定量测定高密度脂蛋白中胆固醇的量的方法，它包括：
将含有高密度脂蛋白和除高密度脂蛋白之外的脂蛋白的试样与一种表面活性剂和一种物质接触，形成所述物质与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白的配合物，其中所述表面活性剂不溶解高密度脂蛋白或除高密度脂蛋白之外的脂蛋白；和

在所述物质与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白的配合物存在下，酶法定量测定高密度脂蛋白中的胆固醇的量。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述物质包括一种聚阴离子、一种二价金属离子、一种水溶性聚合物或者一种针对除高密度脂蛋白之外的脂蛋白的抗体。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述物质包括糊精硫酸盐、磷钨酸、肝素、镁离子、钙离子或聚乙二醇。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述表面活性剂选自聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯-聚氧丙烯缩合产物、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐和烷基苯磺酸盐。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述表面活性剂是聚氧乙烯十六烷基醚、聚氧乙烯壬基苯基醚、聚氧乙烯十二烷基醚硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠。

6. 权利要求 1 的方法，其中用胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶酶法定量测定高密度脂蛋白中的胆固醇。

说 明 书

定量测定胆固醇的方法

本发明涉及一种测定高密度脂蛋白中胆固醇的方法,该方法不需要象离心分离这样的预处理,而且有效地提供了仅需少量试样的简单分析方法。

象胆固醇这样的血清类脂与脱辅基蛋白质结合形成脂蛋白。根据物理性质的不同,脂蛋白可分类为乳糜微粒、很低密度的脂蛋白、低密度脂蛋白(LDLs)和高密度脂蛋白(HDLs)。在这些脂蛋白中,LDLs是致动脉粥样化的,而HDLs具有抗动脉粥样化的作用。

高密度脂蛋白中胆固醇含量与动脉硬化发病率有关已经在流行病学上得到证实。为了预测和诊断局部缺血疾病,测定高密度脂蛋白中的胆固醇现在是相当普遍的。

已知道几种方法用于测定高密度脂蛋白中的胆固醇。例如,在一种方法中,胆固醇是在使用超离心作用把高密度脂蛋白从其它脂蛋白中分离后测定的。在另一种方法中,类脂在用电泳法分离后染色,而且测定显色强度。但是,这些方法都有些问题,象复杂的步骤、不能处理许多试样等等。因此,这些方法没有在临床实验室中经常使用。

在临床实验室中,测定高密度脂蛋白中胆固醇最广泛采用的方法是沉淀法。在沉淀法中,沉淀剂加到试样中来凝结除高密度脂蛋白之外的脂蛋白,凝结的脂蛋白通过离心分离而沉淀,测定只含高密度脂蛋白的上清液中存在的胆固醇。

尽管这种方法比起速离心或电泳更简单,但不是所有的分析步骤可以是完全自动的。因为这种方法包括使用离心作用的分离操作。与其它自动的临床测试相比,在这种方法中,为获得只含高密度脂蛋白的上清液的手动过程增加了造成分析误差的危险,而且需要较多量的试样。

另一方面,研究了使用酶分级测定高密度脂蛋白中胆固醇的方

法。例如,在已知的一种方法中,在胆汁酸盐或非离子表面活性剂存在的情况下进行酶反应(日本专利申请公开 No.63-126,498)。酶反应速率在反应开始阶段与低密度脂蛋白的浓度成正比,此后与高密度脂蛋白中胆固醇浓度成正比,这种方法是以此为根据的。这种方法不能说是精确的,因为与高密度脂蛋白中胆固醇的酶反应不能同与其它脂蛋白的酶反应完全区分开。换句话说,在酶反应条件下,低密度脂蛋白中的胆固醇转变到高密度脂蛋白中的胆固醇不是以分步的方式而是以部分重迭的逐渐的方式进行的。

根据另一种已知方法,将除高密度脂蛋白之外的脂蛋白预先凝结,而且只有高密度脂蛋白中的胆固醇是酶反应的。此后,使酶失活,凝结的脂蛋白同时再溶解以测定吸收性(日本专利申请公开 No.6-242,110)。这种方法至少需要加入试剂三次。因此,这种方法只能用于有限的分析仪,导致有关使用范围方面的缺陷。另外,在重新溶解沉淀物时,需使用高浓度的盐。因此,不论从对分析仪器有害的角度看,还是从处理废试剂困难的角度看,这种方法都不令人满意。

因此,本发明的一个目的是提供一种定量测定高密度脂蛋白中胆固醇的方法,该方法消除了象离心分离这样的预处理的必要性,有效地提供了简单的测量并且该方法可应用于各种自动分析仪。

在如前所述的情况下,本发明人已进行了精心研究,结果发现,如果一种试样在与一种表面活性剂和一种与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白形成配合物的物质混合后,再进行胆固醇的酶法测量,就可以用自动分析仪有效地定量测定高密度脂蛋白中的胆固醇。这导致了本发明的完成。

本发明涉及一种定量测定高密度脂蛋白中胆固醇的方法,其特征在于,试样中胆固醇的测定是在该试样中加入一种表面活性剂和一种与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白形成配合物的物质后进行的。

在本发明中使用的与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白形成配合物的物质可以是与高密度脂蛋白的亲合力不同于与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白的亲合力的任何物质。这类物质的例子包括象糊精硫酸盐、磷钨酸和肝素这样的聚阴离子;象镁离子和钙离子这样的二价金

属离子；象聚乙二醇这样的水溶性聚合物；和针对除高密度脂蛋白之外的脂蛋白的抗体。它们可以单独或两种结合或两种以上结合使用。在这些可能性中，聚阴离子与二价金属离子的结合是优选的。

这些物质的使用量不受特别限制，根据物质种类而不同。这些物质在测定时与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白形成配合物就足够了。凝结可能发生或不可能发生。例如，当一种聚阴离子与一种二价金属离子结合使用时，当它们与试样混合后优选的是聚阴离子浓度为 0.02~2wt%，二价金属离子为 10~500mM。更优选的情况是，聚阴离子浓度为 0.05~1wt%，二价金属离子为 20~200mM。

本发明中使用的表面活性剂最好对用于检测胆固醇和脂蛋白的多种酶之间的相互作用有抑制效果，换句话说，表面活性剂最好不溶解脂蛋白。这类表面活性剂的例子包括聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚，聚氧乙烯-聚氧丙烯缩合产物，聚氧乙烯烷基醚硫酸盐和烷基苯磺酸盐。聚氧乙烯烷基醚的优选实例包括聚氧乙烯十六烷基醚(HLB14)(作为商品，有 Kao Corp. 等生产的 Emulgen 220)。聚氧乙烯烷基苯基醚的优选实例包括聚氧乙烯壬基苯基醚(HLB15)(作为商品，有 Kao Corp. 等生产的 Emulgen 913)。聚氧乙烯-聚氧丙烯的缩合产物的优选实例包括 Asahi Denka K.K. 生产的市场上买得到的 Pluronic F88。聚氧乙烯烷基醚硫酸盐的优选实例包括聚氧乙烯十二烷基醚硫酸钠(作为商品，有 Kao Corp. 等生产的 Emal 20C)。烷基苯磺酸盐的优选实例包括十二烷基苯磺酸钠。

这些表面活性剂可以单独使用或者两种或两种以上表面活性剂结合使用。尽管它们的用量不受特别限制，但与一种试样混合后，在这样的用量中，优选使用的浓度是 0.01~5wt%，特别优选的浓度是 0.05~1wt%。

在本发明中，一种表面活性剂和一种与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白形成配合物的物质加到一种试样中。这两种物质可以在混合后作为一种试剂加入，或者它们可以作为两种独立的试剂加入。

然后，对已加入表面活性剂和与除高密度脂蛋白之外的脂蛋白形成配合物的物质的试样直接测定胆固醇。即不需要象离心分离这

样的预处理。

任何酶学方法可用于测定胆固醇。例如,胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶可作为酶试剂结合使用。另一方面,胆固醇酯酶与胆固醇脱氢酶可以结合使用。在这些酶方法中,胆固醇酯酶与胆固醇氧化酶结合使用的方法是优选的。

加入一种酶后,测定一定时间内的信号量,以此确定胆固醇的浓度。为提高分析的准确性,在加入酶后,可以比较两个确定时间点之间的信号量(两点法)。为了校准的目的,相似地分析一种已知高密度脂蛋白值的试样。

在加入酶试剂后的最后阶段,测定胆固醇的方法不受特别限制。例如,可以使用一种吸收分析法,其中过氧化物酶与色原结合;也可使用检测辅酶和过氧化氢的方法。

实施例:

以下将通过实施例描述本发明,这些实施例不能解释为对本发明的限制。

实施例 1:

用含脂蛋白的 1-10 号血清试样,通过本发明方法和传统的沉淀方法测定高密度脂蛋白中的胆固醇,并对获得的数据进行比较。结果列于表 1。

简单地说,4 μ l 试样与含 0.2% 磷钨酸、100mM 氯化镁和 0.5% 的聚氧乙烯-聚氧丙烯缩合物(Asahi Denka K.K.生产的 Pluronic F-68)的 300 μ l 试剂混合。随后加入含有 0.2U/ml 胆固醇酯酶、0.2U/ml 胆固醇氧化酶、0.3U/ml 过氧化物酶、0.04% N,N-二甲基间甲苯胺、0.05% 氨基安替比林和 0.1% Triton X-100 的 100 μ l 胆固醇测定试剂。其后,监测 545nm 处吸收度的变化,通过把这一吸收度的变化与已知高密度脂蛋白值的试样的吸收度变化相比较来获得高密度脂蛋白中胆固醇的浓度。用 Hitachi 公司的型号为 7150 的自动分析仪进行上述操作。

在独立使用一种沉淀法测定高密度脂蛋白中胆固醇时,含 0.

3%葡聚糖硫酸盐和2%氯化镁的水溶液0.2ml与0.2ml的试样混合。以3000rpm对混合物离心分离10分钟。收集50 μ l上清液并与如上所述配制的3ml胆固醇测定试剂相混合,随后在37 $^{\circ}$ C温育10分钟。测定545nm处的吸收情况,获得高密度脂蛋白中胆固醇浓度。

表 1

试样号	胆固醇浓度 (mg/dl)	
	本发明方法	沉淀法
1	79	80
2	65	64
3	64	64
4	64	58
5	15	18
6	81	88
7	47	48
8	38	38
9	47	46
10	33	32

从表1中结果看,可理解的是,尽管本发明的方法是简单的,但所得的数据可与用传统方法所得数据相比。

实施例2:

用含脂蛋白的11-20号试样,通过本发明方法和传统的沉淀方法测定高密度脂蛋白中的胆固醇,而且对所得数据进行比较。结果列于表2。简单地说,4 μ l试样与含0.2%磷钨酸、1.8g/l葡聚糖硫酸盐、100mM氯化镁及0.2%聚氧乙烯-聚氧丙烯浓缩物(Asahi Denka K.K.生产的Pluronic F-68)的300 μ l试剂结合。随后,加入同实施例1一样的100 μ l胆固醇测定试剂。此后,通过与实施例1相似的方法,获得高密度脂蛋白中胆固醇浓度。

独立地进行如实施例 1 中描述的沉淀方法。

表 2

试样号	胆固醇浓度 (mg/dl)	
	本发明方法	沉淀法
11	47	45
12	38	34
13	36	32
14	54	52
15	26	22
16	93	92
17	61	62
18	36	32
19	55	50
20	75	74

从表 2 中结果看,可理解的是,尽管本发明的方法是简单的而且仅需少量试样,但所得的数值可与通过传统方法所得数值相比。

根据本发明,通过简单的方法可有效地测定高密度脂蛋白中的胆固醇。此方法不需要象离心分离这样的任何预处理。因为此法用少量试样和简单操作提供定量的测定,所以可以在各种自动分析仪中采用。因此,此法在临床化验领域是非常有用的。