



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 15 207 T2** 2004.04.22

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 878 716 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 15 207.7**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 302 436.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **30.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.11.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **04.06.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.04.2004**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 33/92**
C12Q 1/60

(30) Unionspriorität:

13771397 **13.05.1997** **JP**

13771497 **13.05.1997** **JP**

(73) Patentinhaber:

Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, JP

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

Miki, Yutaka, Amagasaki-shi, JP; Imajo, Nobuko, Amagasaki-shi, JP; Koyama, Isao, Amagasaki-shi, JP; Hanada, Toshiro, Amagasaki-shi, JP

(54) Bezeichnung: **Messung von LDL-Cholesterin**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Messen von Cholesterin in Lipoproteinen geringer Dichte (nachfolgend bezeichnet als „LDL“), die in Leberkörperproben vorhanden sind, wie beispielsweise Serum, Plasma, usw.

[0002] Die Hauptbestandteile von Lipiden im Serum sind Cholesterin, Triglyceride, Phospholipide, usw. Diese Serumlipide binden an Apoproteine unter Erzeugung von Lipoproteinen, die im Blut zirkulieren. Die Lipoproteine lassen sich nach den Unterschieden in der Dichte einteilen in Lipoproteine hoher Dichte (HDL), Lipoproteine geringer Dichte (LDL), Lipoproteine sehr hoher Dichte (VLDL) und Chylomikrone (CM), usw. Unter diesen Lipoproteinen hat HDL die Funktion des Transports von überschüssigem Cholesterin, das sich auf Geweben abgelagert, zur Leber zu transportieren und hat eine antiarteriosklerotische Wirkung. Andererseits ist LDL eine Hauptträgersubstanz von Cholesterin aus der Leber zum jeweiligen Gewebe. Eine Erhöhung an LDL scheint in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Arteriosklerose zu stehen.

[0003] Das Cholesterin im LDL (nachfolgend bezeichnet als „LDL-Cholesterin“) wird daher im Zusammenhang mit einem Risikofaktor für Arteriosklerose und ischämischer Herzerkrankungen (arteriosklerotische Gefäßerkrankung) gebracht. Daher ist der Gehalt an LDL-Cholesterin ein wichtiger Hinweis für die Diagnose, Therapie und Prophylaxe dieser Erkrankungen.

[0004] Als Methoden zur Messung von LDL-Cholesterin sind eine Fällungsmethode, eine Ultrazentrifugenmethode, eine Elektrophoresemethode und die Methode nach Friedewald bekannt gewesen. Unter diesen Methoden haben die Fällungsmethode, die Ultrazentrifugenmethode und die Elektrophoresemethode komplizierte Prozeduren, was auf Vorbehandlungsschritte zurückzuführen ist, wie beispielsweise die Trennung des LDL von nicht benötigten anderen Lipoproteinen als LDL durch Ausfällungs-/oder Zentrifugenbehandlungen, Ultrazentrifugenbehandlung oder Elektrophoresebehandlung. Das Problem bei diesen Methoden besteht darin, dass eine direkte Messung unter ausschließlicher Anwendung eines Autoanalyzers, der auf dem Gebiet der klinischen Tests breite Anwendung findet, nicht möglich ist.

[0005] Andererseits besteht bei der Friedewald-Methode, die durch die Friedewald-Gleichung bekannt ist und worin der Gesamtwert des Cholesterins, ein HDL-Cholesterinwert und ein Triglyceridwert für die Berechnung verwendet werden, ein Problem darin, dass es unmöglich ist, eine genaue LDL-Cholesterin-Menge im Fall der Verwendung einer Probe mit einem Gehalt von 500 mg/dl oder darüber an Triglyceriden zu messen.

[0006] Um die vorgenannten Probleme zu lösen, sind zahlreiche Methoden entwickelt worden. Beispielsweise wird in der JP-A-7-280812 eine Methode offenbart, die das Koagulieren von LDL unter Verwendung einer Koagulans und/oder eines Antikörpers umfasst, das Eliminieren (Verbrauchen) von Cholesterin, das in anderen Lipoproteinen als LDL enthalten ist, indem es in ein anderes Reaktionssystem eingeführt wird, das nicht zu der quantitativen Reaktion gehört; Auflösen des koagulierten LDL bis zu einem Grad, indem man in der Lage ist, die quantitative Reaktion unter Verwendung eines Tensids und/oder anorganischen Salzes auszuführen; und Messen der Absorption der Lösung, indem man das LDL-Cholesterin der quantitativen Reaktion unterzieht.

[0007] Da bei dieser Methode jedoch ein System mit drei Reagenzien oder ein System mit vier Reagenzien bei der Messung eingesetzt wird, wenn sie auf nur wenige Autoanalyser angewendet werden, bei denen derartige Mehrfachreagenziensysteme verwendet werden können. Viele Autoanalyser, die üblicherweise bei klinischen Tests verwendet werden, können nicht zur Anwendung kommen, da diese Autoanalyser lediglich mit einer Zweireagenzienmethode verwendet werden können. Außerdem besteht bei dieser Methode ein Problem darin, dass aufgrund der Verwendung einer Reihe von Reagenzien die Reproduzierbarkeit der gemessenen Werte herabgesetzt ist.

[0008] Um LDL-Cholesterin ohne komplizierte Vorbehandlungen zu messen, gibt es ein Verfahren, das in der JP-A-58-165800 offenbart wurde. Nach diesem Verfahren wird jedoch die Herstellung von Reagenzien kompliziert, da die anwendbaren Konzentrationen eines Tensids und einer Cholesterinesterase z. B. in den Reagenzien beschränkt ist. Darüber hinaus lassen sich die Messbedingungen, wie beispielsweise der pH-Wert zum Zeitpunkt der Messung, die Intervalle der Messzeiten, usw. schwer einstellen. Darüber hinaus kann das LDL-Cholesterin, da das Cholesterin in dem HDL in gewissem Umfang reagiert, lediglich mit Hilfe einer kinetischen Messung gemessen werden, d. h. mit einem Geschwindigkeitsassay. So lässt sich von einem derartigen Prozess nicht gerade sagen, dass es ein praktisches Messverfahren ist.

[0009] Die WO 96/29599 und EP-A-0 764 848 offenbaren eine Methode zum Quantifizieren der Cholesterin-Menge in LDL, die das enzymatische Bestimmen (unter Verwendung von Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase/Dehydrogenase) der Cholesterin-Menge in einer Probe in Gegenwart einer Zuckerverbindung und/oder eines nicht ionischen oder anionischen Tensids als Proteinsolubilisierendes Mittel umfasst. Das Verfahren ist hinsichtlich der Genauigkeit jedoch unzureichend.

[0010] Die EP-A-0 698 791 offenbart eine Methode zum Bestimmen der Cholesterin-Menge in dem jeweiligen

LDL, VLDL und CM in einer Probe unter Anwendung der in der EP-A-0 764 848 beschriebenen Methode und der Berechnung der Differenz zwischen dem vorgenannten Gehalt und dem Gesamtgehalt an Cholesterin in der Probe.

[0011] Die EP-A-0 763 741 offenbart eine Methode zum Bestimmen der Cholesterin-Menge in LDL in einer Probe, die das Eliminieren von Cholesterin in HDL in der Probe umfasst und das enzymatische Messen der Menge von LDL-Cholesterin in Gegenwart von Cyclodextrin und einem nicht ionischen oder kationischen Tensid.

[0012] Die EP-A-0 402 094 offenbart eine Methode zum quantitativen Bestimmen der Menge des Gesamtcholesterins in Körperflüssigkeiten, in denen die enzymatische Reaktion in Gegenwart von einem oder mehreren kationischen und/oder amphoteren Tensiden ausgeführt wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Messen von LDL-Cholesterin in einer Lebendkörperprobe zu gewähren, indem ein Autoanalyzer oder dergleichen direkt ohne komplizierte Vorbehandlungen für das Abtrennen von LDL von nicht erforderlichen anderen Lipoproteinen als LDL (was in den vorstehend genannten bekannten Verfahren erforderlich ist) verwendet wird sowie Reagenzien, die bei einem solchen Prozess angewendet werden.

[0014] Die vorliegende Erfindung gewährt ein Verfahren zum Messen von Cholesterin in Lipoproteinen geringer Dichte, die in einer Lebendkörperprobe vorliegen, indem ein Reaktionsprodukt der Probe mit einem Reagens optisch gemessen wird und die Ausführung der Reaktion der Probe mit Cholesterinoxidase oder Cholesterindehydrogenase in Gegenwart eines Amphotensids und mindestens eines Vertreters umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon.

[0015] Nach einer der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren: Behandeln der Probe mit einem ersten Reagens, das mindestens einen Vertreter aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon;

Messen eines Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades der resultierenden Lösung;

Behandeln der resultierenden Lösung mit einer zweiten Reagenslösung, die Cholesterinoxidase enthält;

Messen eines anderen Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades der resultierenden abschließenden Lösung; sowie

Ermitteln der Cholesterin-Menge in der Probe auf der Grundlage der vorstehend gemessenen Daten des Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades;

worin in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens ein Kuppler, ein Entwickler, Peroxidase, ein Amphotensid und Cholesterinesterase enthalten sind.

[0016] Die vorliegende Erfindung gewährt ferner Reagenzien, die bei den vorgenannten Verfahren verwendet werden können.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0017] Für die Messung der Cholesterin-Menge in Lipoproteinen geringer Dichte in einer Lebendkörperprobe, wie beispielsweise Serum und Plasma, ohne eine Vorbehandlung zum Abtrennen des LDL-Cholesterins von nicht erforderlichen anderen Lipoproteinen als LDL haben die Erfinder der vorliegenden Patentanmeldung entdeckt, dass, wenn LDL-Cholesterin in der Probe in Gegenwart eines Amphotensids und Cyclodextrin und/oder eines Derivats davon gemessen wird, die Cholesterin-Menge in LDL präzise und direkt unter Verwendung eines Autoanalyzers ohne bekannte komplizierte Vorbehandlungen erhalten wird.

[0018] Nach der vorliegenden Erfindung kann LDL-Cholesterin in einer Lebendkörperprobe präzise in Gegenwart eines Amphotensids und Cyclodextrin und/oder eines Derivats davon unter Anwendung beispielsweise eines Autoanalyzers gemessen werden.

[0019] Das Verfahren zum Messen der Menge von LDL-Cholesterin in einer Lebendkörperprobe nach der vorliegenden Erfindung umfasst:

Ausführen der Reaktion der Probe mit Cholesterinoxidase oder Cholesterindehydrogenase in Gegenwart eines Amphotensids und mindestens eines Vertreters, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon, und

optisches Messen der Cholesterin-Menge, z. B. durch konventionelles Messen von optischen Änderungen.

[0020] Nach einer der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren:

Behandeln der Lebendkörperprobe mit einem ersten Reagens, das mindestens einen Vertreter aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon;

Messen einer optischen Änderung, wie beispielsweise des Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades der resultierenden Lösung;

Behandeln der resultierenden Lösung mit einer zweiten Reagenslösung, die Cholesterinoxidase (nachfolgend

bezeichnet als „COD“) enthält;

Messen einer anderen optischen Änderung, wie beispielsweise eines Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades, der resultierenden abschließenden Lösung; sowie

Ermitteln der Cholesterin-Menge in der Probe auf der Grundlage der vorstehend gemessenen Daten der optischen Änderungen;

worin in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens ein Kuppler, ein Entwickler, Peroxidase, ein Amphotensid und Cholesterinesterase enthalten sind.

[0021] Nach einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren:

Behandeln der Probe mit einem ersten Reagens, das mindestens einen Vertreter aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon;

Messen einer optischen Änderung, wie beispielsweise einem Absorptionsgrad, Transmissionsgrad, usw., der resultierenden Lösung;

Behandeln der resultierenden Lösung mit einer zweiten Reagenslösung, die Cholesterindehydrogenase enthält (nachfolgend bezeichnet als „CHD“);

Messen einer anderen optischen Änderung, wie beispielsweise Absorptionsgrad, Transmissionsgrad, usw., der resultierenden abschließenden Lösung; und

Ermitteln der Cholesterin-Menge in der Probe auf der Grundlage der vorstehend gemessenen Daten der optischen Änderungen;

worin in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Phosphat), ein Amphotensid und Cholesterinesterase enthalten sind.

[0022] Eine Reagens-Zusammensetzung zum Messen von LDL-Cholesterin der vorliegenden Erfindung weist Cholesterinoxidase oder Cholesterindehydrogenase, ein Amphotensid und Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon auf.

[0023] Nach einer der Ausführungsformen der Reagens-Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung weist die Reagens-Zusammensetzung auf:

(a) ein erstes Reagens, das mindestens einen Vertreter enthält, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon;

(b) ein zweites Reagens, das COD enthält, und

(c) einen Kuppler, einen Entwickler, Peroxidase (nachfolgend bezeichnet als „POD“), ein Amphotensid und Cholesterinesterase (nachfolgend bezeichnet als „CHE“), die mindestens entweder in dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens enthalten sind.

[0024] Nach einer weiteren Ausführungsform der Reagens-Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung weist die Reagens-Zusammensetzung auf:

(a) ein erstes Reagens, das Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon, ein Amphotensid und CHE enthält;

(b) ein zweites Reagens, das COD und CHE enthält; und

(c) einen Kuppler, einen Entwickler und POD, die mindestens entweder in dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens enthalten sind.

[0025] Die Reagenzien der vorliegenden Erfindung können in Form einer diagnostischen Ausrüstung verwendet werden, aufweisend:

einen ersten Behälter, der ein erstes, Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon aufweisendes Reagens enthält, ein Amphotensid, CHE und einen Kuppler (oder Entwickler); und

einen zweiten Behälter, der ein zweites, COD, CHE, POD und einen Entwickler (oder eine Kuppler) aufweisendes Reagens enthält.

[0026] Als das Amphotensid können alle beliebigen so lange verwendet werden, wie sie verhindern, dass das in anderen Lipoproteinen als dem LDL enthaltene Cholesterin an der Reaktion der Cholesterinmessung in gleichzeitiger Gegenwart von Cyclodextrin und/oder Derivaten davon teilnimmt. Beispiele für das Amphotensid sind Betain-Derivate, z. B. Alkylbetaine, wie beispielsweise Laurylbetain, Stearylbetain, Lauryldimethylammoniumbetain, Kokosnuss-Betain, Kokosnussöl-Fettsäureamidopropylbetain und Laurinsäureamidopropylbetain; Imidazoliumbetain-Derivate, wie beispielsweise Laurylcarboxymethylhydroxyethylimidazoliumbetain, 2-Alkyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethylimidazoliumbetaine, 2-Alkyl-N-carboxyethyl-N-hydroxyethylimidazoliumbetain und 2-Undecyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethylimidazoliumbetain; Sulfobetain-Derivate, wie beispielsweise N-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonsäure, N-Decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonsäure, N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonsäure, N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonsäure und N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonsäure; Aminocarbonsäure-Derivate, wie beispielsweise Alkylglycine, Alkyldi(aminoethyl)glycine, Dioctylpolyaminoethylglycin, N-Alkylpolyaminoethylglycine und β -Alanin-Derivate; Imidazolin-Derivate, wie beispielsweise Bis-(2-undecyl-N-hydroxyethylimidazolin)chloroessigsäure-Komplex und Alkylimidazolin-Derivate; Aminoxid-Derivate, wie beispielsweise Lauryldimethylaminoxid. Diese Amphotenside können allein oder als Mischung davon verwendet

- werden. Diese Amphotenside können solche sein, die kommerziell verfügbar sind, und solche, die nach konventionellen Methoden synthetisch dargestellt werden.
- [0027] Die Konzentration der Anwendung dieser Amphotenside im Fall der gleichzeitigen Anwesenheit von Cyclodextrin ist so lange nicht speziell beschränkt, wie das Amphotensid verhindern kann, dass das in anderen Lipoproteinen als LDL enthaltene Cholesterin an der Reaktion der Cholesterinmessung teilnimmt. Die bevorzugte Konzentration des Amphotensids in der abschließenden Lösung (Reaktionslösung) zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt 0,0001 bis 10% (Gewicht/Volumen) und mehr bevorzugt 0,001 bis 1% (Gewicht/Volumen).
- [0028] Die Konzentration des Amphotensids im jeweiligen Reagens bei der Durchführung der Methode mit 2 Reagenzien für die Messung der Änderungen von LDL-Cholesterin hängt von den Mengen der Probe ab, von dem ersten Reagens und dem zweiten Reagens. Wenn das Amphotensid lediglich im ersten Reagens enthalten ist, wird die Konzentration des Amphotensids bevorzugt ausgewählt aus dem Bereich 0,0002 bis 20% (Gewicht/Volumen) und mehr bevorzugt 0,002 bis 2% (Gewicht/Volumen). Wenn das Amphotensid lediglich in dem zweiten Reagens enthalten ist, wird die Konzentration des Amphotensids bevorzugt ausgewählt aus dem Bereich 0,0002 bis 20% (Gewicht/Volumen) und mehr bevorzugt 0,002 bis 2% (Gewicht/Volumen). Wenn darüber hinaus das Amphotensid sowohl in dem ersten als auch in dem zweiten Reagens enthalten ist, beträgt die Konzentration des Amphotensids bevorzugt 0,0001 bis 20% (Gewicht/Volumen) und mehr bevorzugt 0,001 bis 2% (Gewicht/Volumen) im ersten Reagens und bevorzugt 0,0001 bis 20% (Gewicht/Volumen) und mehr bevorzugt 0,001 bis 20% (Gewicht/Volumen) im zweiten Reagens.
- [0029] Als das Cyclodextrin und/oder Derivat davon kann so lange jedes beliebige verwendet werden, wie sie verhindern können, dass das in anderen Lipoproteinen als LDL enthaltene Cholesterin zu der Reaktion der Cholesterinmessung in gleichzeitiger Gegenwart von Amphotensid beiträgt.
- [0030] Beispiele für Cyclodextrin sind α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin, γ -Cyclodextrin, usw.
- [0031] Beispiele für Cyclodextrin-Derivate sind alkylierte Cyclodextrine, wie beispielsweise 2,6-Di-O-methyl- α -cyclodextrin, 2,3,6-Tri-O-methyl- α -cyclodextrin, 2,6-Di-O-ethyl- α -cyclodextrin, 2,3,6-Tri-O-ethyl- α -cyclodextrin, 2,6-Di-O-methyl- β -cyclodextrin, 2,3,6-Tri-O-methyl- β -cyclodextrin, 2,6-Di-O-ethyl- β -cyclodextrin, 2,3,6-Tri-O-ethyl- β -cyclodextrin, 2,6-Di-O-methyl- γ -cyclodextrin, 2,3,6-Tri-O-methyl- γ -cyclodextrin, 2,6-Di-O-ethyl- γ -cyclodextrin und 2,3,6-Tri-O-ethyl- γ -cyclodextrin; hydroxyalkylierte Cyclodextrine, wie beispielsweise 2-Hydroxyethyl- α -cyclodextrin, 2-Hydroxypropyl- α -cyclodextrin, 3-Hydroxypropyl- α -cyclodextrin, 2,3-Dihydroxypropyl- α -cyclodextrin, 2-Hydroxyethyl- β -cyclodextrin, 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 3-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 2,3-Dihydroxypropyl- β -cyclodextrin, 2-Hydroxyethyl- γ -cyclodextrin, 2-Hydroxypropyl- γ -cyclodextrin, 3-Hydroxypropyl- γ -cyclodextrin und 2,3-Dihydroxypropyl- γ -cyclodextrin; acylierte Cyclodextrine, wie beispielsweise 2,3,6-Tri-O-acetyl- α -cyclodextrin, 2,3,6-Tri-O-acetyl- β -cyclodextrin und 2,3,6-Tri-O-acetyl- γ -cyclodextrin; Zucker-modifizierte Cyclodextrine, wie beispielsweise 6-O- α -D-Glucosyl- α -cyclodextrin, 6-O- α -D-Maltosyl- α -cyclodextrin, 6-O- α -D-Glucosyl- β -cyclodextrin, 6-O- α -D-Maltosyl- β -cyclodextrin, 6-O- α -D-Glucosyl- γ -cyclodextrin und 6-O- α -D-Maltosyl- γ -cyclodextrin; carboxyalkylierte Cyclodextrine, wie beispielsweise O-Carboxymethyl- α -cyclodextrin, O-Carboxymethyl- β -cyclodextrin und O-Carboxymethyl- γ -cyclodextrin; polymere Cyclodextrine, wie beispielsweise Poly- α -cyclodextrin, Poly- β -cyclodextrin und Poly- γ -cyclodextrin. Für diese Cyclodextrine und Derivate davon können kommerzielle verfügbare verwendet werden. Außerdem können in der vorliegenden Erfindung solche verwendet werden, die nach bekannten Methoden synthetisch dargestellt wurden, die offenbart wurden in den US-P-3 453 258, 3 453 259, Polymer Journal, Bd. 13, Nr. 8, S. 777-781 (1981), die JP-A-61-266401, 63-122701 und 62-243602.
- [0032] Die Konzentration der Anwendung dieser Cyclodextrine und/oder Derivate davon ist so lange nicht speziell beschränkt, wie diese Cyclodextrine und deren Derivate verhindern können, dass das in anderen Lipoproteinen als dem LDL enthaltene Cholesterin an der Reaktion der Cholesterinmessung teilnimmt. Die bevorzugte Konzentration der Cyclodextrin und deren Derivate in der abschließenden Lösung (Reaktionslösung) zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt bevorzugt 0,0001 bis 10% (Gewicht/Volumen) und mehr bevorzugt 0,001 bis 1% (Gewicht/Volumen).
- [0033] Darüber hinaus hängt die Konzentration der Cyclodextrine und deren Derivate in dem ersten Reagens bei der Ausführung der Methode mit zwei Reagenzien zur Messung der Änderungen des LDL-Cholesterins von den Mengen der Probe ab, von dem ersten Reagens und dem zweiten Reagens. In der Regel liegt der Bereich der Konzentration bei 0,0002 bis 20% (Gewicht/Volumen), vorzugsweise 0,002 bis 2% (Gewicht/Volumen).
- [0034] Diese Cyclodextrine und deren Derivate lassen sich allein oder als eine Mischung davon verwenden.
- [0035] Zusätzlich zu den vorgenannten Amphotensiden und Cyclodextrinen und deren Derivate können nach den erfindungsgemäßen Verfahren zum Messen konventionelle Reagenzien zu Cholesterinmessung verwendet werden.
- [0036] Das bedeutet, LDL-Cholesterin kann in einer Lebendprobe, wie beispielsweise Serum, Plasma, usw., speziell mit Hilfe einer konventionellen Methode in Gegenwart von Cyclodextrin und/oder einem Derivat davon, beispielsweise unter Anwendung einer enzymatischen Reaktion, gemessen werden.
- [0037] Ein solcher konventioneller Prozess (ein Prozess der oxidativen Farberzeugung) umfasst das Zerset-

zen des Cholesterinesters in einer Probe mit CHE, um freies Cholesterin und die Fettsäure zu ergeben, Oxidieren des Produktes zusammen mit freiem Cholesterin, das von Beginn an mit COD vorliegt, um Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid zu ergeben; Ausführen der Reaktion der oxidativen Farberzeugung eines oxidierbaren farberzeugenden Reagens mit dem erzeugten Wasserstoffperoxid in Gegenwart von POD; und den erzeugten oxidierten Farbstoff einer colorimetrischen Bestimmung unterziehen.

[0038] Ein anderer konventioneller Prozess (Prozess der UV-Messung) umfasst das Zersetzen von Cholesterinester in einer Probe mit CHE, um freies Cholesterin und die Fettsäure zu ergeben, Umsetzen mit Nicotinamidadeninindinukleotid oder dessen Phosphat (nachfolgend bezeichnet als „NAD(P)“) in Gegenwart des von Beginn an vorhandenen freien Cholesterins und CHD; und Messen des erzeugten NAD(P)H unter Anwendung von ultraviolettem Licht von 340 nm.

[0039] Das in der vorliegenden Erfindung verwendete COD ist auf seine Herkunft nicht speziell beschränkt. Es können solche verwendet werden, wie sie konventionell auf dem Gebiet zur Anwendung gelangen, beispielsweise solche, die von Mikroorganismen hergeleitet sind, wie beispielsweise *Nocardia* Genera und *Pseudomonas* Genera sowie von tierischen Organen, wie beispielsweise Rinderpankreas. Die Anwendungsmenge von COD in der abschließenden Reaktionslösung zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt vorzugsweise 0,02 bis 10 u/ml und mehr bevorzugt 0,1 bis 2 u/ml.

[0040] Das in der vorliegenden Erfindung verwendete CHE ist auf seine Herkunft nicht speziell beschränkt. Es können solche verwendet werden, wie sie konventionell auf dem Gebiet zur Anwendung gelangen, beispielsweise solche, die von Mikroorganismen hergeleitet sind, wie beispielsweise *Candida* Genera und *Pseudomonas* Genera, sowie von tierischen Organen, wie beispielsweise Rinderpankreas. Die Anwendungsmenge von CHE in der abschließenden Reaktionslösung zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt bevorzugt 0,02 bis 10 u/ml, mehr bevorzugt 0,1 bis 2 u/ml.

[0041] Das in der vorliegenden Erfindung verwendete POD ist auf seine Herkunft nicht speziell beschränkt. Es können solche verwendet werden, wie sie konventionell auf dem Gebiet zur Anwendung gelangen, beispielsweise solche, die von Pflanzen hergeleitet sind, wie beispielsweise Meerrettich und Rettich; Mikroorganismen, wie beispielsweise Schimmel und Hefe; sowie Leukozyten und Schilddrüsen von Tieren. Die Anwendungsmenge von POD in der abschließenden Reaktionslösung zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt bevorzugt 0,01 bis 50 u/ml, mehr bevorzugt 0,1 bis 5 u/ml.

[0042] Als die Reagenzien zur oxidativen Farberzeugung, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können solche zur Anwendung gelangen, die eine Farbe erzeugen, wenn sie mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von POD reagieren. Beispiele dafür sind eine Kombination eines Kupplers, wie beispielsweise 4-Aminoantipyrin (4-AA) und ein Entwickler, der einen Farbstoff durch oxidative Kondensation mit dem Kuppler erzeugen kann, beispielsweise eine Kombination von 4-AA und einer phenolischen Verbindung, einer Naphthol-Verbindung oder einer Anilin-Verbindung, einer Kombination von 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrozon und einer Anilin-Verbindung, usw.; farberzeugende Mittel, die eine Farbe von sich aus durch Oxidation erzeugen können, wie beispielsweise 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure), Triphenylmethan-Leukofarbstoffe, Diphenylamin-Derivate, Benzidin-Derivate, Triallylimidazol-Derivate, Leuco-Methanblau-Derivate und o-Phenylendiamin-Derivate.

[0043] Als Entwickler können Phenyl-Verbindungen verwendet werden, wie beispielsweise: Phenol, p-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol; Naphthanol-Verbindungen, wie beispielsweise 1-Naphthol, 1-Naphthol-2-sulfonsäure und 1-Naphthol-2-carbonsäure; Anilin-Verbindungen, wie beispielsweise N,N-Diethylanilin, N-Ethyl-N-(β -hydroxyethyl)-m-toluidin, N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin, (DAOS), N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxy-4-fluoranilin (FDAOS), N-(2-Hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin (HDAOS), N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin (TOOS) und N-Ethyl-N-(3-methylphenyl)-N'-succinyl-ethylendiamin (EMSE).

[0044] Die Anwendungsmenge des Kupplers, sofern der Kuppler in Kombination mit einem Entwickler verwendet wird, ändert sich in Abhängigkeit von der Art des Kupplers, von der Art des Entwicklers, die vereint werden sollen. Die Konzentration des Kupplers in der abschließenden Lösung (Reaktionslösung zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung) beträgt bevorzugt 0,01 bis 100 mM und mehr bevorzugt 0,1 bis 10 mM. Sofern 4-AA als Kuppler verwendet wird, beträgt die Konzentration von 4-AA in der abschließenden Reaktionslösung zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung bevorzugt 0,01 bis 50 mM, mehr bevorzugt 0,1 bis 5 mM.

[0045] Die Anwendungsmenge des Entwicklers ändert sich in Abhängigkeit von der Art des Entwicklers und der Art des Kupplers, die vereint werden. Die Konzentration des Entwicklers in der abschließenden Reaktionslösung zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt bevorzugt 0,01 bis 50 mM, mehr bevorzugt 0,1 bis 5 mM.

[0046] Beispiele für die Triphenylmethan-Leukofarbstoffe sind Leukomalachitgrün, Bis(p-diethylaminophenyl)-2-sulfophenylmethan, Bis-(p-diethylaminophenyl)-3,4-disulfopropoxyphenylmethan-Dinatriumsalz, usw.

[0047] Beispiele für die Diphenylamin-Derivate sind Bis(4-di(2-butoxyethyl)amino-2-methylphenyl)amin, N,N-bis(4-diethylamino-2-methylphenyl)-N'-p-toluolsulfonylharnstoff, usw.

[0048] Beispiele für die Leukomethylenblau-Derivate sind 10-(Carboxymethylaminocarbonyl)-3,7-bis(dime-

- thylamino)phenothiazin-Natriumsalz, 10-[3-(Methoxycarbonylaminomethyl)phenylmethylaminocarbonyl]-3,7-bis(dimethylamino)phenothiazin, usw.
- [0049] Beispiele für die Benzidin-Derivate sind Benzidin, o-Toluidin, o-Dianisidin, 3,3'-Diaminobenzidin, 3,3',5,5'-Tetraaminobenzidin, usw.
- [0050] Beispiele für Triallylimidazol-Derivate sind 2-(4-Carboxyphenyl)-3-N-methylcarbamoyl-4,5-bis(4-diethylaminophenyl)imidazol, 2-(3-Methoxy-4-diethylaminophenyl)-3-N-methylcarbamoyl-4,5-bis(2-methyl-4-diethylaminophenyl)imidazol, usw.
- [0051] Die Anwendungsmenge dieser farberzeugenden Mittel wird geeigneterweise aus den konventionell zur Anwendung gelangenden Bereichen auf diesem Gebiet gewählt.
- [0052] Das in der vorliegenden Erfindung verwendete CHD ist auf seine Herkunft nicht beschränkt. Es können konventionell verwendete zur Anwendung gelangen, wie beispielsweise die von Nocardia Genera hergeleiteten, usw. Die Anwendungsmenge in der fertigen Reaktionslösung zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt vorzugsweise 0,1 bis 100 u/ml, mehr bevorzugt 1 bis 50 u/ml.
- [0053] Das in der vorliegenden Erfindung verwendete NAD(P) ist nicht speziell beschränkt und es können auch solche verwendet werden die konventionell auf diesem Gebiet zur Anwendung gelangen. Die Anwendungsmenge von NAD(P) in der fertigen Lösung (Reaktionslösung) zum Zeitpunkt der Cholesterinmessung beträgt bevorzugt 0,02 bis 50 mM, mehr bevorzugt 0,1 bis 10 mM.
- [0054] Die Reagenzien für die Messung von LDL-Cholesterin, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind solche, wie sie konventionell zur Messung von LDL-Cholesterin in einer Probe zur Anwendung gelangen, die von einem Lebewesen abgenommen wurde, wie beispielsweise Serum, Plasma, usw. mit der Ausnahme der Verwendung des Amphotensids und Cyclodextrins und/oder dessen Derivate. Die konventionell verwendeten Reagenzien schließen ein: COD, CHE, POD, oxidierbare farberzeugende Reagenzien, usw., die in dem Prozess der oxidativen Farberzeugung verwendet werden; CHE, CHD, NAD(P), usw., die in dem Prozess der Messung von violetterem Licht verwendet werden. Diese Reagenzien werden in Konzentrationen verwendet, die zum Messen von LDL-Cholesterin geeignet sind.
- [0055] Die Reagenzien zum Messen von LDL-Cholesterin, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können für eine Methode mit einem Reagens, für eine Methode mit zwei Reagenzien oder eine Methode mit drei oder mehreren Reagenzien hergestellt werden. Wenn die Reagenzien in zwei oder mehrere Reagenzien unterteilt sind, sind die folgenden Zusammensetzungen hinsichtlich der Spezifität, der Messgenauigkeit, usw. bevorzugt.
- [0056] Im Fall des Prozesses der oxidativen Farberzeugung schließt das erste Reagens Cyclodextrin und/oder dessen Derivat ein und das zweite Reagens schließt COD ein. Andere Reagenzien, wie beispielsweise Amphotenside, Enzyme, wie beispielsweise CHE und POD, Kuppler und Entwickler, können in mindestens dem ersten oder zweiten Reagens einbezogen werden.
- [0057] Im Fall des Prozesses der UV-Messung ist in dem ersten Reagens Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon einbezogen und in dem zweiten Reagens CHD einbezogen sowie andere Reagenzien, wie beispielsweise NAD(P), die in mindestens entweder dem ersten oder zweiten Reagens einbezogen sind.
- [0058] Wenn das erfindungsgemäße Verfahren nach einer Methode mit zwei Reagenzien ausgeführt wird, wird eine Probe mit einem ersten Reagens behandelt, das Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon einschließt, beispielsweise durch Mischen der Probe mit dem ersten Reagens, wobei die behandelte Probe umgesetzt wird mit einem zweiten Reagens, in das COD oder CHD einbezogen ist, und zwar in Gegenwart des Cyclodextrins und/oder eines Derivats davon und des Amphotensids. Diese vorgenannten Schritte sind vom Standpunkt der Spezifität, der Messgenauigkeit, usw. bevorzugt.
- [0059] Im Fall des Prozesses der oxidativen Farberzeugung werden die folgenden Kombinationen von Reagenzien bevorzugt verwendet:
- (i) ein erstes Reagens, einschließend Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon und ein Amphotensid, ein zweites Reagens, einschließend COD, und ein Kuppler, ein Entwickler, POD und CHE, die in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen sind;
 - (ii) ein erstes Reagens, einschließend Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon und CHE, ein zweites Reagens, einschließend COD, und ein Kuppler, ein Entwickler, POD und ein Amphotensid, die in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen sind, und
 - (iii) ein erstes Reagens, einschließend Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon, Amphotensid und CHE, ein zweites Reagens, einschließend COD, und ein Kuppler, ein Entwickler und POD, die in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen sind;
- [0060] Im Fall des Prozesses der Messung von ultraviolettem Licht sind die folgenden Kombinationen von Reagenzien bevorzugt verwendet:

- (i') ein erstes Reagens, einschließlich Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon und ein Amphotensid, ein zweites Reagens, einschließlich CHD, und NAD(P) und CHE, die in mindestens dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen sind;
- (ii') ein erstes Reagens, einschließlich Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon und CHE, ein zweites Reagens, einschließlich CHD, und NAD(P) und ein Amphotensid, die in mindestens dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen sind, und
- (iii') ein erstes Reagens, einschließlich Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon, ein Amphotensid und CHE, ein zweites Reagens, einschließlich CHD, und NAD(P), das in entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen ist.

[0061] Wenn die Reagenzien zum Messen des LDL-Cholesterins der vorliegenden Erfindung für eine Methode mit zwei Reagenzien hergestellt werden, liegen vorzugsweise das Amphotensid und/oder CHE gemeinsam mit dem Cyclodextrin und/oder einem Derivat davon in dem ersten Reagens vor, um die Spezifität des LDL-Cholesterins und die Messgenauigkeit des LDL-Cholesterins zu verbessern.

[0062] Darüber hinaus besteht unter den Kombinationen der vorstehend genannten Reagenzien, bei gleichzeitigem Vorhandensein von Amphotensid und CHE die Möglichkeit einer Verringerung der Stabilität der CHE-Aktivität durch das Amphotensid. Daher wird in diesem Fall vorzugsweise CHE sowohl in das erste Reagens als auch in das zweite Reagens einbezogen. Im Fall von Reagenzien für den Prozess der oxidativen Farberzeugung werden in das erste Reagens Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon, ein Amphotensid und CHE einbezogen und in das zweite Reagens werden COD und CHE einbezogen, und ein Kuppler, ein Entwickler und POD werden in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen. Im Fall von Reagenzien für den Prozess der UV-Messung sind in das erste Reagens Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon, ein Amphotensid und CHE einbezogen, in das zweite Reagens sind CHD und CHE einbezogen und NAD(P) ist in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens einbezogen.

[0063] Zusätzlich zu der vorgenannten Kombination von Reagenzien für den Prozess der oxidativen Farberzeugung sind in dem ersten Reagens entweder bevorzugt ein Kuppler und ein Entwickler einbezogen, während der Rest von ihnen bevorzugt in dem zweiten Reagens einbezogen ist.

[0064] Die Reagenzien zum Messen von LDL-Cholesterin nach der vorliegenden Erfindung können ein oder mehrere Puffer enthalten. Die in der vorliegenden Erfindung verwendbaren Puffer hängen von den Kombinationen der verschiedenen Enzyme und Reagenzien der oxidativen Farberzeugung ab, wobei jedoch konventionelle Puffer verwendet werden können, die üblicherweise auf diesem Gebiet zur Anwendung gelangen. Bevorzugt ist die Verwendung von Puffern mit einer Pufferwirkung im pH-Bereich 5 bis 11. Die Puffer können vorzugsweise in einer Konzentration von 1 mM bis 5 M und mehr bevorzugt 5 mM bis 1 M verwendet werden.

[0065] Unter Berücksichtigung der Spezifität auf LDL-Cholesterin sind bevorzugte Beispiele für die Puffer: Aminoethansulfonsäure-Derivate, wie beispielsweise N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure (ACES), N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES), N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES), 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES), Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES) und N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES); Aminopropansulfonsäure-Derivate, wie beispielsweise N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure (CAPS), N-Cyclohexyl-2-hydroxy-3-aminopropansulfonsäure (CAPSO), 3-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropansulfonsäure (DEPSO), 3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propansulfonsäure (EPPS), 2-Hydroxy-3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propansulfonsäure (HEPPSO), 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 2-Hydroxy-3-morpholinopropansulfonsäure (MOPSO), Piperazin-1,4-bis(2-hydroxy-3-propansulfonsäure) (POPSO), N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropan-sulfonsäure (TAPS) und 2-Hydroxy-N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure (TAPSO); aliphatische Amine, die eine Carboxyl-Gruppe oder Sulfonsäure-Gruppe haben, wie beispielsweise Glycin-Derivate, z. B. N-(2-Acetamido)iminodiessigsäure (ADA), N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicine), N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin (Tricine), usw.

[0066] In die Reagenzien zur Messung von LDL-Cholesterin nach der vorliegenden Erfindung können eine oder mehrere ionische Verbindungen einbezogen sein, wie beispielsweise Polyanionen, z. B. Dextransulfat, Heparin, Heparansulfat und Wolframatophosphorsäure, und zwar einzeln oder als Mischung davon. Darüber hinaus ist es möglich, zweiwertige Kationen zu verwenden, wie beispielsweise Mg^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} (oder ein oder mehrere Metallsalze, die diese zweiwertigen Kationen erzeugen können) in Kombination mit der ionischen Verbindung. Die Konzentration dieser Additive ist nicht speziell beschränkt. Die Konzentration der ionischen Verbindung in der abschließenden Lösung (Reaktionslösung) beträgt vorzugsweise 0,01 bis 10% (Gewicht/Volumen). Die Konzentration der zweiwertigen Kationen in der abschließenden Lösung (Reaktionslösung) beträgt bevorzugt 0,1 bis 200 mM.

[0067] In die Reagenzien zur Messung von LDL-Cholesterin nach der vorliegenden Erfindung können ein oder mehrere polyklonale Antikörper oder monoklonale Antikörper einbezogen sein, um Cholesterin in anderen

Lipoproteinen als LDL an der Teilnahme der Reaktion der Cholesterinmessung abzuhalten.

[0068] Beispiele für derartige Antikörper sind Anti-Apolipoprotein-A-Antikörper, Anti-Apolipoprotein-C-Antikörper, Anti-Apolipoprotein-E-Antikörper, Anti- α -Lipoprotein-Antikörper, usw.

[0069] Die Konzentration dieser Antikörper ist so lange nicht speziell beschränkt, wie sie verhindern, dass in anderen Lipoproteinen als dem LDE-enhaltenes Cholesterin an der Reaktion der Cholesterinmessung teilnimmt. Bevorzugt werden diese Antikörper der abschließenden Lösung (Reaktionslösung) zugesetzt, um die Konzentration auf 0,001 bis 10 mgAb/ml und mehr bevorzugt 0,01 bis 1 mgAb/ml zu bringen.

[0070] Die Reagenzien zur Messung des LDL-Cholesterins nach der vorliegenden Erfindung können ferner ein oder mehrere andere Tenside als die Amphotenside enthalten, die konventionell auf diesem Gebiet zur Anwendung gelangen, wie beispielsweise nicht ionische Tenside, wie beispielsweise Polyoxyethylen- isooctylphenylether, Polyoxyethylenalkylphenylether, Polyoxyethylenonylphenylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenoleylether, Polyethylglykolmonolaurat und Polyethylenlaurylether; Kationtenside, wie beispielsweise Stearyltrimethylammoniumchlorid und Alkylbenzyltrimethylammoniumchloride; Aniontenside, wie beispielsweise Cholinsäure, Desoxycholinsäure und Polyoxyethylenalkylphenylether-Natriumsulfonat. Diese Tenside können einzeln oder als eine Kombination davon verwendet werden. Die Konzentration dieser Tenside ist nicht speziell beschränkt, liegt vorzugsweise jedoch im Bereich von 0,0001 bis 10% (Gewicht/Volumen), mehr bevorzugt 0,001 bis 1% (Gewicht/Volumen) in der abschließenden Lösung (Reaktionslösung).

[0071] Das LDL-Cholesterin kann nach der vorliegenden Erfindung im Fall der Methode mit zwei Reagenzien wie folgt gemessen werden:

1) Prozess der oxidativen Farberzeugung

[0072] Es wird eine Lebendkörperprobe, wie beispielsweise Serum und Plasma, mit einem ersten Reagens gemischt, das beispielsweise ein Amphotensid enthält, Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon, CHE und einen Kuppler (oder einen Entwickler) und nach Erfordernis einen oder mehrere Puffer, Antikörper, ionische Verbindungen, zweiwertige Kationen, usw., um die Probe zu behandeln, gefolgt von einer Reaktion für 1 bis 30 Minuten bei 2° bis 40°C und der Messung der Absorption (OD_1). Danach wird die Reaktionslösung mit einem zweiten Reagens gemischt, das beispielsweise COD enthält, CHE, POD und einen Entwickler (oder einen Kuppler) und nach Erfordernis einen oder mehrere Puffer, usw., gefolgt von der Reaktion für 1 bis 60 Minuten bei 2° bis 40°C und der Messung der Absorption (OD_2). Sodann wird die Absorption (OD_3) erhalten, indem der von OD_1 abgeleitete Wert (z. B. ein Wert, der durch Multiplikation von OD_1 mit einem Korrekturkoeffizienten erhalten wird) von OD_2 subtrahiert wird. Der resultierende OD_3 -Wert wird auf eine Eichkurve angewendet, in der eine Beziehung zwischen den LDL-Cholesterinkonzentrationen dargestellt ist, und der OD_3 -Wert nach den gleichen Prozeduren, wie sie vorstehend ausgeführt wurden, unter Verwendung von Standardlösungen erhalten, z. B. mit einem Gehalt bekannter Cholesterin-Mengen. Auf diese Weise lässt sich der LDL-Cholesterinwert in der Lebendprobe erhalten.

2) Prozess der UV-Messung

[0073] Eine Lebendkörperprobe, wie beispielsweise Serum und Plasma, wird mit einem ersten Reagens gemischt, das beispielsweise ein Amphotensid enthält, Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon und CHE und nach Erfordernis ein oder mehrere Puffer, Antikörper, ionische Verbindungen, zweiwertige Kationen, usw., um die Probe zu behandeln, gefolgt von der Reaktion für 1 bis 30 Minuten bei 2° bis 40°C und Messung der Absorption (OD_1') bei 340 nm. Danach wird die Reaktionslösung mit einem zweiten Reagens gemischt, das beispielsweise CHD enthält, CHE und NAD(P) sowie nach Erfordernis einen oder mehrere Puffer, gefolgt von einer Reaktion für 1 bis 60 Minuten bei 2° bis 40°C und der Messung der Absorption (OD_2') bei 340 nm. Danach wird die Absorption (OD_3') erhalten, indem der von OD_1' derivierte Wert (beispielsweise ein Wert, der durch Multiplikation von OD_1' mit einem Korrekturkoeffizienten erhalten wird) von OD_2' subtrahiert wird. Der resultierende OD_3' -Wert wird auf eine Eichkurve angewendet, die eine Beziehung zwischen den LDL-Cholesterinkonzentrationen und dem OD_3' darstellt, der nach den gleichen Prozeduren, wie sie vorstehend erwähnt wurden, unter Anwendung von Standardlösungen erhalten wird, z. B. mit einem Gehalt bekannter Cholesterin-Mengen. Auf diese Weise lässt sich der LDL-Cholesterinwert in der Lebendprobe erhalten.

[0074] Wenn der Prozess der Messung des LDL-Cholesterins nach der vorliegenden Erfindung mit Hilfe der Methode mit einem Reagens ausgeführt wird, können die folgenden Schritte eingesetzt werden:

1) Prozess der oxidativen Farberzeugung

[0075] Es wird eine Lebendkörperprobe, wie beispielsweise Serum und Plasma, mit einer Reagenslösung gemischt, die beispielsweise CHE enthält, COD, POD, ein Reagens zur oxidativen Farberzeugung, ein Amphotensid und Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon und nach Erfordernis einen oder mehrere Puffer, Antikörper

per, ionische Verbindungen, zweiwertige Kationen, usw., gefolgt von einer Reaktion für 1 bis 30 Minuten bei 2° bis 40°C und der Messung der Absorption (OD_S). Ein Blindwert (OD_{B1}) wird erhalten, indem die gleichen Reagenzien, wie sie vorstehend genannt wurden, verwendet werden und die gleichen Prozeduren, wie sie vorstehend ausgeführt wurden, ausgeführt werden, während anstelle der Lebendkörperprobe physiologische Kochsalzlösung verwendet wird. Sodann wird die Absorption (OD_R) erhalten, indem OD_{B1} von OD_S subtrahiert wird. Der resultierende OD_R -Wert wird auf die Eichkurve angewendet, die eine Beziehung zwischen den LDL-Cholesterinkonzentrationen und dem OD_R darstellt, das unter Anwendung der gleichen Prozeduren, wie sie vorstehend ausgeführt wurden, unter Verwendung von Standardlösungen erhalten wird, z. B. mit einem Gehalt bekannter Cholesterin-Mengen. Auf diese Weise lässt sich der LDL-Cholesterinwert in der Lebendkörperprobe erhalten.

2) Prozess der UV-Messung

[0076] Eine Lebendkörperprobe, wie beispielsweise Serum und Plasma, wird mit einer Reagenslösung gemischt, die beispielsweise CHE enthält, CHD, NAD(P), ein Amphotensid, Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon und nach Erfordernis einen oder mehrere Puffer, Antikörper, ionische Verbindungen, zweiwertige Kationen, usw., gefolgt von der Reaktion für 1 bis 30 Minuten bei 2° bis 40°C und Messung der Absorption (OD_S') bei 340 nm. Ein Blindwert (OD_{B1}') wird erhalten, indem die gleichen Reagenzien, wie sie vorstehend genannt wurden, zur Anwendung gelangen und die gleichen Prozeduren, wie sie vorstehend ausgeführt wurden, ausgeführt werden, während anstelle der Lebendprobe physiologische Kochsalzlösung verwendet wird. Sodann wird die Absorption (ODR') erhalten, indem OD_{B1}' von OD_S' subtrahiert wird. Der resultierende OD_S' -Wert wird auf eine Eichkurve angewendet, die eine Beziehung zwischen den LDL-Cholesterinkonzentrationen und dem OD_S' darstellt, der unter Anwendung der gleichen Prozeduren, wie sie vorstehend ausgeführt wurden, unter Verwendung von Standardlösungen erhalten wird, z. B. mit einem Gehalt bekannter Cholesterin-Mengen. Auf diese Weise lässt sich der LDL-Cholesterinwert in der Lebendprobe erhalten.

[0077] In den vorgenannten Fällen können anstelle der Absorption als eine optische Änderung andere optische Änderungen verwendet werden, wie beispielsweise der Transmissionsgrad.

[0078] Die Ausrüstung zum Messen des LDL-Cholesterins nach der vorliegenden Erfindung wird für LDL-Cholesterin in einer Probe angewendet, die von einem Lebendkörper abgenommen wird, wie beispielsweise Serum und Plasma, und die folgende Beschaffenheit hat:

1) für den Prozess der oxidativen Farberzeugung

ein erster Behälter, der ein erstes Reagens enthält, das Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon aufweist, ein Amphotensid, CHE und einen Kuppler (oder einen Entwickler) und

ein zweiter Behälter, der ein zweites Reagens enthält, das COD aufweist, CHE, POD und einen Entwickler (oder einen Kuppler);

2) für einen Prozess der UV-Messung

ein erster Behälter, der ein erstes Reagens enthält, das Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon aufweist, ein Amphotensid und CHE, und

ein zweiter Behälter, der ein zweites Reagens enthält, das CHD aufweist, NAD(P) und CHE.

[0079] Bevorzugte Ausführungsformen und Beispiele für einzelne elementare Bestandteile sind die, wie sie vorstehend genannt wurden. Es muss nicht erwähnt werden, dass die Ausrüstung mit LDL-Cholesterin-Standardsubstanzen kombiniert werden kann.

[0080] Die erfindungsgemäßen Verfahren zum Messen des LDL-Cholesterins können in Gegenwart eines Amphotensids und Cyclodextrin und/oder einem Derivat davon ausgeführt werden, so dass das Cholesterin in anderen Lipoproteinen als dem LDL, z. B. nicht nur HDL, sondern auch VLDL, CM, usw., nicht wesentlich zu der Reaktion beiträgt und LDL-Cholesterin spezifisch reagiert, was dazu führt, dass die Messung des LDL-Cholesterins mit Hilfe des Endpunktassays möglich wird, was bei konventionellen Prozessen unmöglich war. Was die Standardsubstanzen betrifft, ist es außerdem nicht erforderlich, reines LDL-Cholesterin zu verwenden. Anstelle dessen ist es möglich, eine Standardlösung zu verwenden, die Cholesterin oder ein Standardserum mit den gleichen Eigenschaften wie Viskosität und Dichte enthält, wie normales Serum.

[0081] Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele veranschaulicht, die jedoch nicht einschränkend sind.

Beispiel 1

[0082] Unter Verwendung eines Autoanalyzers vom Typ Hitachi 7170 (hergestellt von Hitachi, Ltd.) wurde zur Untersuchung des Reaktionsvermögens von Cholesterin in verschiedenen durch Ultrazentrifugation fraktionierten Lipoproteinen nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gemessen.

[Proben]

[0083] Als Proben wurden LDL-Fraktionen, HDL-Fraktionen, VLDL-Fraktionen und CM-Fraktionen verwendet, die aus Serum durch Fraktionierung unter Anwendung bekannter Methoden der Ultrazentrifugation erhalten wurden.

[0084] In jeder Probe wurde Cholesterin wie früher unter Verwendung einer kommerziell verfügbaren Reagenzausrüstung zum Messen von Gesamtcholesterin gemessen (L-Typ Wako CHO-H, ein Warenzeichen, hergestellt von der Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), und zwar nach einer Standardprozedur, wie sie in der Bedienungsanweisung für die Ausrüstung beschrieben wurde.

[Reagenzien]

(Reagens 1)

[0085] R-1: 50 mM Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)-NaON-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von:

- (i) 2,6-Di-O-methyl- α -cyclodextrin (hergestellt von der Wako Pure Chemical Industries, Ltd., nachfolgend bezeichnet als „DM- α -CD“) 0,06% (Gewicht/Volumen);
- (ii) N-(2-Nydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin-Natriumsalz (HDAOS, hergestellt von Dojindo Laboratories Co., Ltd.) 0,6 mM; und
- (iii) Na₂SO₄ 0,4 M

[0086] R-2: 50 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.) 4 u/ml;
- (ii) CHE (hergestellt von Asahi Kasei Kogyo K. K.) 4 u/ml;
- (iii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.); 4-AA 3 mM; und
- (iv) einem Amphotensid, das in Tabelle 1 dargestellt ist; 0,01% (Gewicht/Volumen).

(Amphotenside)

[0087] Es wurden die folgenden verwendet:

Lipomin LA (Warenzeichen, hergestellt von Lion Corp.), ein Aminocarbonsäure-Derivat.

[0088] Softazolin LPB-R (Warenzeichen, hergestellt von Kawa-Ken Fine Chemical Co., Ltd.), Laurinsäureamidopropylbetain,

[0089] Softazolin CL (Warenzeichen, hergestellt von Kawa-Ken Fine Chemical Co., Ltd.), 2-Alkyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethylimidazoliumbetain,

[0090] Anhitol 24B (Warenzeichen, hergestellt von Kao Corp.), Laurylbetain,

[0091] Enadicol L-30AN (Warenzeichen, hergestellt von Lion Corp.), Natrium-N-lauroyl-N-methyl- β -alanin,

[0092] Zwittergent 3-08 (Warenzeichen, hergestellt von Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), N-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonsäure.

(Reagens 2) [Vergleichsreagens]

[0093] R-1: das gleiche wie Reagens 1

[0094] R-2: das gleiche wie Reagens 1 mit der Ausnahme der Verwendung der folgenden Tenside anstelle der Amphotenside.

(Tenside)

[0095] Emalgen A-90 (Warenzeichen, hergestellt von Kao Corp.), Polyoxyethylen-Derivat,

[0096] Emalgen 709 (Warenzeichen, hergestellt von Kao Corp.), Polyoxyethylenhöherer Alkoholether,

[0097] Triton X-100 (Warenzeichen, hergestellt von Rohm & Haas Co.), Polyoxyethylenalkylphenylether.

(Reagens 3) [Vergleichsreagens]

[0098] R-1: 50 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von NDAOS von 0,6 mM und Na₂SO₄ 0,4 M,

R-2: 50 mM PIPES-NaON-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 4 u/ml,

- (ii) CHE (hergestellt von der Asahi Kasei Kogyo K. K.), 4 u/ml,
 (iii) POD (hergestellt von der Toyobo Co., Ltd.), 6 u/ml, und
 (iv) 4-AA, 3 mM.

[Messbedingungen]

[0099] Die Messparameter wurden zur Messung des Cholesterins in jeder Probe. wie folgt eingestellt:

Messmethode: 2 Punkt-Endpunkt [16]–[34]

Probenmenge: 3 µl

R-1: 270 µl

R-2: 90 µl

Wellenlänge der Messung: 700/600 nm

Messtemperatur: 37°C

Konzentration der Standardsubstanz: 100 mg/dl

[Ergebnisse]

[0100] Umwandlung jedes Lipoproteins in% wurde erhalten, indem der Cholesterinwert, der von jeder Probe erhalten wurde, und der Cholesterinwert, der von jeder Probe unter Verwendung einer kommerziell verfügbaren Ausrüstung verwendet wurde, in die folgende Formel eingesetzt wurden:

Formel: Umwandlung (%) = (aus der Probe erhaltener Cholesterinwert) (mit kommerzieller Ausrüstung erhaltener Cholesterinwert) × 100

[0101] Diese Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Tensid			Umwandlung von Lipoproteinen (%)			
			LDL	HDL	VLDL	CM
Reagens 1	Lipomin LA	amphoter	94	4	6	4
	Softazolin LBP-R	amphoter	101	0	13	5
	Softazolin CL	amphoter	100	0	0	2
	Anhitol 24B	amphoter	98	0	8	3
	Enadicol L-30AN	amphoter	98	0	11	7
	Zwitter 3-08	amphoter	100	1	9	6
Reagens 2*	Emalgen A-90	nicht ionisch	65	54	51	20
	Emalgen 709	nicht ionisch	86	45	24	25
	Triton X-100	nicht ionisch	93	42	0	19
Reagens 3*	kein Zusatz von Tensid		103	86	99	98
	kein Zusatz von DM-α-CD					

* Vergleichsreagens

[0102] Wie aus den in Tabelle 1 gezeigten Ergebnissen klar zu entnehmen ist, werden andere Lipoproteine als LDL bei Verwendung von Reagens 1 kaum umgesetzt, da Cholesterin in Gegenwart eines Amphotensids und DM-α-CD gemessen wird, woraus resultiert, dass die Messung des Cholesterins in LDL spezifisch möglich wird. Im Gegensatz dazu reagieren auch andere Lipoproteine als LDL bei Ausführung der Messung in Gegen-

wart eines nicht ionischen Tensids und DM- α -CD (Reagens 2) und in Abwesenheit eines Tensids und von DM- α -CD (Reagens 3), woraus resultiert, dass spezifisch kein LDL-Cholesterin gemessen werden kann.
[0103] Wie vorstehend ausgeführt, ist es erforderlich, zur spezifischen Messung des Cholesterins in LDL die Messung in Gegenwart eines Amphotensids und von Cyclodextrin und/oder einem Derivat davon auszuführen.

Beispiel 2

[0104] Ein anderes typisches Beispiel für die Ausrüstung zum Messen von LDL-Cholesterin in einer Lebendprobe läuft wie folgt ab:

- (1) erstes Reagens (pH 6–8)
Cyclodextrin und/oder ein Derivat davon,
Amphotensid,
CHE, und
Kuppler (oder ein Entwickler);
- (2) zweites Reagens (pH 6–8)
COD,
CHE,
POD, und
Entwickler (oder ein Kuppler).

[0105] Es wurden die gleichen Ergebnisse wie in Beispiel 1 erhalten, indem die Ausrüstung verwendet wurde.

Beispiel 3 (nicht im Geltungsbereich der beigefügten Ansprüche)

[0106] Unter Verwendung eines Autoanalyzers vom Typ Hitachi 7170 (hergestellt von Hitachi, Ltd.) wurde zur Untersuchung des Reaktionsvermögens von Cholesterin in verschiedenen durch Ultrazentrifugation fraktionierten Lipoproteinen nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gemessen.

[Proben]

[0107] Als Proben wurden LDL-Fraktionen, NDL-Fraktionen, VLDL-Fraktionen und CM-Fraktionen verwendet, die aus Serum durch Fraktionierung unter Anwendung bekannter Methoden der Ultrazentrifugation erhalten wurden.

[0108] In jeder Probe wurde Cholesterin wie bisher unter Verwendung einer kommerziell verfügbaren Reagensausrüstung zum Messen von Gesamtcholesterin gemessen (L-Typ Wako CNO-H, ein Warenzeichen, hergestellt von der Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), und zwar nach einer Standardprozedur, wie sie in der Bedienungsanweisung für die Ausrüstung beschrieben wurde.

[Reagenzien]

[0109] R-1: 100 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von:

- (i) HDAOS 0,6 mM;
- (ii) Na₂SO₄ 0,4 M;
- (iii) ein Cyclodextrin-Derivat, das in Tabelle 2 gezeigt ist;

[0110] R-2: 100 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 4 u/ml;
- (ii) CHE (hergestellt von Asahi Kasei Kogyo K. K.), 4 u/ml;
- (iii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 6 u/ml; und
- (iv) 4-AA, 3 mM.

[Cyclodextrin-Derivate]

[0111] DM- α -CD (hergestellt von der Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[0112] HP- α -CD (Hydroxypropyl- α -cyclodextrin) (hergestellt von der Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[0113] Poly- β -DC (Poly- β -cyclodextrin) (hergestellt von der Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[Messbedingungen]

[0114] Die Messparameter zur Messung des Cholesterins in jeder Probe wurden wie folgt eingestellt:

Messmethode: 2 Punkt-Endpunkt [16]–[34]
 Probenmenge: 3 µl
 R-1: 270 µl
 R-2: 90 µl
 Wellenlänge der Messung: 700/600 nm
 Messtemperatur: 37°C
 Konzentration der Standardsubstanz: 100 mg/dl

[Ergebnisse]

[0115] Die Umwandlung jedes Lipoproteins in % wurde in der gleichen Weise erhalten, wie in Beispiel 1 beschrieben wurde.

[0116] Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Cyclodextrin-Derivate (Konzentration in R-1)	Umwandlung von Lipoproteinen (%)			
	LDL	HDL	VLDL	CM
kein Zusatz	100	58	100	100
DM- α -CD (0,06%)	102	33	3	2
HP- α -CD (0,1%)	96	40	15	21
DM- α -CD (0,1%)	104	9	0	0
Poly- β -CD (0,01%)				

[0117] Wie aus den in Tabelle 2 gezeigten Ergebnisse klar zu ersehen ist, wird die Reaktion von anderen Lipoproteinen als LDL bei Ausführung der Cholesterinmessung in Gegenwart des/der speziellen Cyclodextrin-Derivates/Derivate merklich unterdrückt. Besonders bei gemeinsamer Verwendung von DM- α -CD und Poly- β -CD reagieren andere Lipoproteine als LDL kaum. Im Gegensatz dazu wurden bei Messung in Abwesenheit eines Cyclodextrin-Derivates die Reaktionen von VLDL und CM überhaupt nicht unterdrückt, woraus resultiert, das LDL-Cholesterin nicht spezifisch gemessen werden kann.

[0118] Wie vorstehend ausgeführt, kann bei Messung des Cholesterins in Lipoproteinen in Gegenwart von mindestens einer Verbindung, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus DM- α -CD und Poly- β -CD das Cholesterin in LDL spezifisch gemessen werden.

Beispiel 4 (nicht im Geltungsbereich der beigefügten Ansprüche)

[0119] Unter Verwendung eines Autoanalyzers vom Typ Hitachi 7170 (hergestellt von Hitachi, Ltd.) wurde zur Untersuchung des Reaktionsvermögens von Cholesterin in verschiedenen durch Ultrazentrifugation fraktionierten Lipoproteinen nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gemessen.

[Proben]

[0120] Die gleichen wie in Beispiel 3.

[Reagenzien]

[0121] R-1: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:
 (i) 4-AA, 1,2 mM;
 (ii) CHE (hergestellt von der Kasei Kogyo K. K.), 1 u/ml, und
 (iii) ein Cyclodextrin-Derivat entsprechend der Angabe in Tabelle 3;

[0122] R-2: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:
 (i) COD (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 4 u/ml;
 (ii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 6 u/ml; und
 (iii) HDAOS, 1,2 mM.

[Cyclodextrin-Derivate]

[0123] Poly- β -CD (hergestellt von der Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[Messbedingungen]

[0124] Die gleichen wie in Beispiel 3.

[0125] [Ergebnisse]

[0126] Die Umwandlungen der einzelnen Lipoproteine wurden in der gleichen Weise erhalten, wie in Beispiel 3 beschrieben wurde.

[0127] Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

Cyclodextrin-Derivate (Konzentration in R-1)	Umwandlung von Lipoproteinen (%)			
	LDL	HDL	VLDL	CM
kein Zusatz	75	97	75	38
Poly- β -CD (0,13%)	99	10	32	16

[0128] Wie aus den Ergebnissen von Tabelle 3 klar ersichtlich, wird die Reaktion mit LDL bei Ausführung der Cholesterinmessung in Gegenwart eines ersten Poly- β -CD und CHE aufweisenden Reagens insgesamt nicht beeinflusst, während die Reaktionen mit anderen Lipoproteinen als LDL merklich unterdrückt werden, woraus resultiert, dass die Ausführung einer spezifischen Messung von LDL-Cholesterin möglich ist. Im Gegensatz dazu werden, wenn das erste Reagens lediglich CHE enthält, nicht nur die Reaktionen mit anderen Lipoproteinen als LDL und speziell die Reaktionen mit HDL und VLDL kaum unterdrückt, wobei jedoch auch die Reaktion mit LDL merklich unterdrückt wird, woraus resultiert, dass Cholesterin in LDL nicht spezifisch gemessen werden kann.

Beispiel 5

[0129] Unter Verwendung eines Autoanalyzers vom Typ Hitachi 7170 (hergestellt von Hitachi, Ltd.) wurde LDL-Cholesterin in Serum gemessen.

[Proben]

[0130] 8 Proben, die aus frischem Humanserum erhalten wurden.

[Reagenzien]

(Reagens 1) [Vergleichsreagens]

[0131] R-1: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) 4-AA, 1,2 mM, und
- (ii) Poly- β -CD, 0,13%;

[0132] R-2: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 4 u/ml;
- (ii) CHE (hergestellt von Amanu Pharmaceutical Co., Ltd.), 4 u/ml; und
- (iii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 6 u/ml,
- (iv) HDAOS, 1,2 mM, und
- (v) Lipomin LA, 0,4%.

(Reagens 2)

[0133] R-1: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) 3-AA, 1,2 mM;
- (ii) CHE (hergestellt von Amanu Pharmaceutical Co., Ltd.), 1 u/ml;
- (iii) Poly- β -CD, 0,13%, und

(iv) Lipomin LA (Warenzeichen für Aminocarbonsäure-Derivat, hergestellt von Lion Corp.)

[0134] R-2: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 4 u/ml;
- (ii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 6 u/ml, und
- (iii) HDAOS, 1,2 mM.

(Reagens 3)

[0135] R-1: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) 4-AA, 1,2 mM;
- (ii) Poly- β -CD, 0,13%;
- (iii) CHE (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 1 u/ml, und
- (iv) Lipomin LA, 0,1%.

[0136] R-2: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 4 u/ml;
- (ii) CHE (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 4 u/ml;
- (iii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 6 u/ml, und
- (iv) HDAOS, 1,2 mM.

(Reagens 4) [Vergleichsreagens]

[0137] R-1: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) 4-AA, 1,2 mM;
- (ii) CHE (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 1 u/ml, und
- (iii) Lipomin LA, 0,1%.

[0138] R-2: 25 mM PIPES-NaOH-Puffer (pH 7,2) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 4 u/ml;
- (ii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 6 u/ml, und
- (iii) HDAOS, 1,2 mM.

[Messbedingungen]

[0139] Die gleichen wie in Beispiel 3.

[Ergebnisse]

[0140] Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt.

Referenzbeispiel 1

[0141] Wie bei der in Beispiel 5 verwendeten Serumprobe wurde der Cholesterinwert in LDL mit Hilfe der Friedewald-Gleichung nach einer konventionellen Methode berechnet.

Tabelle 4

Probe Nr.	Beispiel 5				Ref.Beisp. 1 (mg/dl)
	Reagens 1* (mg/dl)	Reagens 2 (mg/dl)	Reagens 3 (mg/dl)	Reagens 4* (mg/dl)	
1	155	136	135	186	130
2	118	86	87	141	81
3	104	87	89	133	75
4	132	104	106	157	101
5	101	77	79	129	70
6	155	136	137	192	130
7	184	167	167	219	161
8	159	139	140	198	138
Mittelwert	138,5	116,5	117,4	169,4	110,8
Korrel.Koeff. mit Ref. Beisp. 1	0,994	0,996	0,996	0,998	-
Steig. d. Regressions- linie	1,13	1,04	1,05	0,995	-
Regressions- linie auf der y- Achse	-46,4	-9,90	-13,41	-57,73	-

* Vergleichsreagens

[0142] Wie aus den in Tabelle 4 gezeigten Ergebnissen klar ersichtlich ist, liegen die unter Anwendung der Reagenzien, die Poly- β -CD (d. h. Reagens 1 bis 3) enthielten, erhaltenen LDL-Cholesterinwerte nahe den mit Hilfe der konventionellen Friedewald-Gleichung, wie sie in Referenzbeispiel 1 dargestellt wurde berechneten LDL-Cholesterinwert im Vergleich zu dem, der unter Verwendung der Reagenzien erhalten wurde, die kein Poly- β -CD (d. h. Reagens 4) enthielten. Mit anderen Worten kann das LDL-Cholesterin spezifisch gemessen werden.

[0143] Darüber hinaus liegen bei Verwendung von Poly- β -CD gemeinsam mit einem Amphotensid und nach Erfordernis mit CHE (Reagens 2 und 3) die erhaltenen LDL-Cholesterinwerte näher an denjenigen, die durch Berechnung mit der Friedewald-Gleichung erhalten wurden, als dies der Fall unter Verwendung von Poly- β -CD allein ist.

Beispiel 6

[0144] Unter Verwendung eines Autoanalyzers vom Typ Hitachi 7170 (hergestellt von Hitachi, Ltd.) wurde LDL-Cholesterin in Serum gemessen.

[Proben]

[0145] 15 Proben, die aus frischem Humanserum erhalten wurden.

[Reagenzien]

[0146] R-1: 25 mM 2-Hydroxy-N-tris(hydroxymethyl)-methyl-3-aminopropansulfonsäure (TAPSO)-NaON-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von:

- (i) HDAOS, 0,6 mM;
- (ii) CHE (hergestellt von Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 2 u/ml;
- (iii) Poly- β -CD (Poly- β -cyclodextrin) (hergestellt von Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,125%;
- (iv) ein Tensid nach Tabelle 5, 0,15%;

[0147] R-2: 25 mM TAPSO-NaON-Puffer (pH 7,0) mit einem Gehalt von:

- (i) COD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 4 u/ml;
- (ii) POD (hergestellt von Toyobo Co., Ltd.), 10 u/ml,
- (iii) 4-AA, 6 mM.

[Tensid]

[0148] Lipomin LA (Warenzeichen, hergestellt von der Kao Corp.)

[0149] EMALLEX 712 (Warenzeichen, hergestellt von der Nihon Emulsion Co., Ltd.), Polyoxyethylenlaurylether

[0150] EMALLEX 1615 (Warenzeichen, hergestellt von der Nihon Emulsion Co., Ltd.), Polyoxyethylenhexyldecylether

[0151] EMALLEX NP-20 (Warenzeichen, hergestellt von der Nihon Emulsion Co., Ltd.), Polyoxyethylennonylphenylether

[Messbedingungen]

[0152] Die gleichen wie in Beispiel 3.

[Ergebnisse]

[0153] Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt.

Referenzbeispiel 2

[0154] Wie bei der in Beispiel 5 verwendeten Serumprobe wurde der Cholesterinwert in LDL mit Hilfe der Friedewald-Gleichung nach einer konventionellen Methode berechnet.

Tabelle 5

Probe Nr.	Beispiel 6					
	Cholesterinwert (mg/dl)					
	Tensid					Ref.Beisp. 2
keine Zugabe	Lipomin LA	Emalex 712*	Emalex 1615*	Emalex NP-20*		
1	220,03	153,2	94,6	207,9	189,8	149,3
2	213,1	154,2	102,7	230,1	218,1	160,0
3	203,5	147,1	85,4	205,5	192,6	166,6
4	230,8	160,2	93,8	227,2	199,6	179,1
5	233,7	166,6	95,8	227,5	208,1	193,3
6	259,2	180,0	99,4	245,4	221,5	203,8
7	94,0	105,1	73,9	168,8	160,8	122,3
8	191,3	145,4	93,5	213,9	202,1	158,0
9	142,3	126,3	91,1	191,6	186,1	127,8
10	177,9	147,4	95,0	211,1	205,2	150,0
11	204,5	149,9	93,7	213,8	194,8	147,1
12	294,3	238,5	124,3	248,9	249,2	247,0
13	237,7	170,2	102,1	234,1	219,6	175,3
14	291,5	202,7	123,4	273,9	260,4	224,2
15	253,5	171,1	106,2	247,4	238,8	189,9
Mittelwert	216,5	161,2	98,3	223,1	209,8	172,9
Korrel. mit Ref. Beisp. 2	0,914	0,959	0,848	0,881	0,878	-
Steig.d. Regressions- linie	0,598	1,063	2,270	1,174	1,171	-
Schnittpunkt der Regressions- linie mit der y- Achse	43,437	1,571	-50,338	-89,035	-72,813	-

* Vergleichsbeispiele

[0155] Wie aus den in Tabelle 5 gezeigten Ergebnissen klar ersichtlich ist, liegen die unter Anwendung der Reagenzien der vorliegenden Erfindung, die Poly- β -CD und Lipomin LA enthalten, erhaltenen LDL-Cholesterinwerte nahe den mit Hilfe der konventionellen Friedewald-Gleichung, wie sie in Referenzbeispiel 2 dargestellt wurde berechneten LDL-Cholesterinwert im Vergleich zu dem, der unter Verwendung der Reagenzien erhalten wurde, die Poly- β -CD und nicht ionisches Tensid enthielten. Mit anderen Worten kann das LDL-Cholesterin nach der vorliegenden Erfindung spezifisch gemessen werden.

[0156] Wie vorstehend ausgeführt, kann nach der vorliegenden Erfindung das LDL-Cholesterin in einer Le-bendprobe spezifisch und genau unter Verwendung der speziellen Reagenzien der vorliegenden Erfindung ge-

messen werden. Darüber hinaus kann das LDL-Cholesterin unter Anwendung der vorliegenden Erfindung direkt unter Verwendung eines Mehrzweckautoanalyzers gemessen werden, was nach Prozessen des Standes der Technik nicht möglich war.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Messen von Cholesterin in Lipoproteinen geringer Dichte, die in Lebewesenproben vorliegen, wie beispielsweise Serum, Plasma, usw. durch optisches Messen eines Reaktionsproduktes dieser Probe mit einem Reagens, welches Verfahren das Ausführen der Reaktion der Probe mit Cholesterinoxidase oder Cholesterindehydrogenase in Gegenwart eines Amphotensids und mindestens eines Vertreters umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem das Cyclodextrin-Derivat mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Dimethyl- α -cyclodextrin und Poly- β -cyclodextrin.

3. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem das Cyclodextrin-Derivat Poly- β -cyclodextrin ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem das Amphotensid mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Alkylbetain-Derivaten, Imidazoliumbetain-Derivaten, Sulfobetain-Derivaten, Aminocarbonsäure-Derivaten, Imidazolin-Derivaten und Aminoxid-Derivaten.

5. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem das Amphotensid mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Aminocarbonsäure-Derivat, Laurinsäureamidopropylbetain, einem 2-Alkyl-n-carboxymethyl-n-hydroxyethylimidazoliumbetain, Laurylbetain, Natrium-n-lauroyl-n-methyl- β -alanin und n-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonsäure.

6. Verfahren nach Anspruch 1, welches Verfahren umfasst:
Behandeln der Probe mit einem ersten Reagens, das mindestens einen Vertreter aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon;
Messen eines Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades der resultierenden Lösung;
Behandeln der resultierenden Lösung mit einer zweiten Reagenslösung, die Cholesterinoxidase enthält;
Messen eines anderen Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades der resultierenden abschließenden Lösung; sowie
Ermitteln der Cholesterin-Menge in der Probe auf der Grundlage der vorstehend gemessenen Daten des Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades;
worin in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens ein Kuppler, ein Entwickler, Peroxidase, ein Amphotensid und Cholesterinesterase enthalten sind.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei welchem die Konzentration von Cyclodextrin oder Derivaten davon in der Endlösung 0,0001 bis 10% (Gewicht/Volumen) beträgt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, bei welchem die Konzentration des Amphotensids in der Endlösung 0,0001 bis 10% (Gewicht/Volumen) beträgt.

9. Verfahren nach Anspruch 1, welches Verfahren umfasst:
Behandeln der Probe mit einem ersten Reagens, das mindestens einen Vertreter aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon;
Messen eines Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades der resultierenden Lösung;
Behandeln der resultierenden Lösung mit einer zweiten Reagenslösung, die Cholesterindehydrogenase enthält;
Messen eines anderen Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades der resultierenden abschließenden Lösung; sowie
Ermitteln der Cholesterinmenge in der Probe auf der Grundlage der vorstehend gemessenen Daten des Absorptionsgrades oder Transmissionsgrades;
worin in mindestens entweder dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens Nikotinamid-adenin-dinucleotid (Phosphat), ein Amphotensid und Cholesterinesterase enthalten sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei welchem die Konzentration von Cyclodextrin oder Derivaten davon in der Endlösung 0,0001 bis 10% (Gewicht/Volumen) beträgt.

11. Verfahren nach Anspruch 9, bei welchem die Konzentration des Amphotensids in der Endlösung 0,0001 bis 10% (Gewicht/Volumen) beträgt.
12. Reagens-Zusammensetzung zum Messen von Cholesterin in Lipoproteinen geringer Dichte, aufweisend: Cholesterinoxidase oder Cholesterindehydrogenase, ein Amphotensid und mindestens einen Vertreter, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon.
13. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das Cyclodextrin-Derivat mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Dimethyl- α -cyclodextrin und Poly- β -cyclodextrin.
14. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das Cyclodextrin-Derivat Poly- β -cyclodextrin ist.
15. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 12, bei welchem das Amphotensid mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Alkylbetain-Derivaten, Imidazoliniumbetain-Derivaten, Sulfobetain-Derivaten, Aminocarbonsäure-Derivaten, Imidazolin-Derivaten und Aminoxid-Derivaten.
16. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das Amphotensid mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Aminocarbonsäure-Derivat, Laurinsäureaminopropylbetain, einem 2-Alkyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethylimidazoliniumbetain, Laurylbetain, Natrium-N-lauroyl-N-methylbetaalamin und N-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonsäure.
17. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin die Konzentration von Cyclodextrin oder Derivaten davon 0,0002 bis 20% (Gewicht/Volumen) beträgt.
18. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin die Konzentration des Amphotensids 0,0001 bis 20% (Gewicht/Volumen) beträgt.
19. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 12, aufweisend:
(a) ein erstes Reagens, das mindestens einen Vertreter enthält, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon;
(b) ein zweites Reagens, das Cholesterinoxidase enthält, und
(c) einen Kuppler, einen Entwickler, Peroxydase, ein Amphotensid und Cholesterinesterase, die mindestens entweder in dem ersten Reagens oder dem zweiten Reagens enthalten sind.
20. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das Cyclodextrin-Derivat mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Dimethyl- α -cyclodextrin und Poly- β -cyclodextrin.
21. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das Amphotensid mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Alkylbetain-Derivaten, Imidazoliniumbetain-Derivaten, Sulfobetain-Derivaten, Aminocarbonsäure-Derivaten, Imidazolin-Derivaten und Aminoxid-Derivaten.
22. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das Cyclodextrin-Derivat mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Alkylbetain-Derivaten, Imidazoliniumbetain-Derivaten, Sulfobetain-Derivaten, Aminocarbonsäure-Derivaten, Imidazolin-Derivaten und Aminoxid-Derivaten.
23. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das Amphotensid mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Aminocarbonsäure-Derivat, Laurinsäure-aminopropylbetain, einem 2-Alkyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethylimidazoliniumbetain, Laurylbetain, Natrium-N-lauroyl-N-methylbetaalamin und N-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonsäure.
24. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin die Konzentration von Cyclodextrin oder Derivaten davon 0,0002 bis 20% (Gewicht/Volumen) beträgt.
25. Reagens-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin die Konzentration des Amphotensids 0,0001 bis 20% (Gewicht/Volumen) beträgt.
26. Ausrüstung zum Messen von Cholesterin in Lipoproteinen niedriger Dichte, wobei die Ausrüstung aufweist:
(a) einen ersten Behälter, der ein erstes Reagens enthält, das ein Amphotensid aufweist, Cholesterinesterase,

einen Kuppler oder einen Entwickler und mindestens einen Vertreter, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cyclodextrin und Derivaten davon, und

(b) einen zweiten Behälter, der ein zweites Reagens enthält, das Cholesterinoxidase aufweist, Cholesterinesterase, Peroxydase und einen Entwickler oder einen Kuppler.

27. Ausrüstung nach Anspruch 26, worin das Cyclodextrin-Derivat mindestens eine Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Dimethyl- α -cyclodextrin und Poly- β -cyclodextrin.

28. Ausrüstung nach Anspruch 26, worin das Cyclodextrin-Derivat Poly- β -cyclodextrin ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen