



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I497077 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：103103748

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 05 日

(51)Int. Cl. : G01N33/82 (2006.01)

(30)優先權：2013/02/06 日本

2013-021284

2014/01/20 日本

PCT/JP2014/050996

(71)申請人：富士瑞必歐股份有限公司 (日本) FUJIREBIO INC. (JP)

日本

(72)發明人：內田好昭 UCHIDA, YOSHIAKI (JP)；佐久拓彌 SAKYU, TAKUYA (JP)；小見和也 OMI, KAZUYA (JP)

(74)代理人：丁國隆

(56)參考文獻：

JP 2010-518369A

WO 2011/052620

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：7 共 55 頁

(54)名稱

維他命D之測定方法及測定用套組

(57)摘要

本發明提供一種維他命D之測定方法。

具體而言，本發明提供一種維他命D之測定方法，其係含有以下：1)以具有類固醇骨架之界面活性劑來處理樣品；及2)檢測處理後之樣品中之維他命D。

本發明亦提供一種維他命D之測定用套組，其係含有以下：1)具有類固醇骨架之界面活性劑；以及2)對維他命D為之親和性物質及/或維他命D標準品。

作為具有類固醇骨架之界面活性劑，可列舉例如膽汁酸或是其衍生物或該等之鹽。

發明摘要

公告本

※ 申請案號：103103748

※ 申請日：103.1.5

※IPC 分類：G01N33/82 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

維他命D之測定方法及測定用套組

【中文】

本發明提供一種維他命D之測定方法。

具體而言，本發明提供一種維他命D之測定方法，其係含有以下：

- 1)以具有類固醇骨架之界面活性劑來處理樣品；及
- 2)檢測處理後之樣品中之維他命D。

本發明亦提供一種維他命D之測定用套組，其係含有以下：

- 1)具有類固醇骨架之界面活性劑；以及
- 2)對維他命D為之親和性物質及/或維他命D標準品。

作為具有類固醇骨架之界面活性劑，可列舉例如膽汁酸或是其衍生物或該等之鹽。

【英文】

無。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

維他命D之測定方法及測定用套組

【技術領域】

【0001】本發明係關於維他命D之測定方法等。

【先前技術】

【0002】已知維他命D類(以下，僅簡稱為維他命D)係於血中與結合蛋白質(DBP：維他命D結合蛋白質。亦稱為Gc球蛋白)強固地結合。因此，為了以抗原抗體法正確地測定維他命D，係必須進行維他命D與DBP的解離操作(前處理)。作為如此之前處理，除了變性劑(例如，酸、蛋白質變性劑、界面活性劑、水解酵素)之外亦使用有機溶劑(例如，乙醇、甲醇、DMSO)(專利文獻1～7)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0003】

[專利文獻1]國際公開第03/104820號

[專利文獻2]國際公開第07/039194號

[專利文獻3]國際公開第02/046746號

[專利文獻4]國際公開第04/063704號

[專利文獻5]國際公開第08/092917號

[專利文獻6]國際公開第02/057795號

[專利文獻7]國際公開第07/140962號

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0004】本發明係提供一種維他命D之測定方法等。

[解決課題之手段]

【0005】本發明人等，努力探討的結果發現，藉由以具有膽固醇骨架之界面活性劑來處理含維他命D之樣品，可正確地測定維他命D等，而完成了本發明。

【0006】亦即，本發明係如以下。

[1]一種維他命D之測定方法，其係包含以下：

- 1)以具有類固醇骨架之界面活性劑來處理樣品；及
- 2)檢測處理後之樣品中之維他命D。

[2]如[1]之方法，其中，上述界面活性劑，係膽汁酸或是其衍生物或該等之鹽。

[3]如[1]或[2]之方法，其中，上述界面活性劑，具有於7位不具羥基之類固醇骨架。

[4]如[1]至[3]中任一項之方法，其中，上述界面活性劑，係去氧膽酸或是牛去氧膽酸(taurodeoxycholic acid)或該等之鹽。

[5]如[1]至[4]中任一項之方法，其進一步包含：以與前述界面活性劑不同之其他變性劑來處理樣品。

[6]如[5]之方法，其中，其他變性劑，係含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑。

[7]如[1]至[6]中任一項之方法，其中，樣品之處理係僅以混合來進行。

[8]如[1]至[7]中任一項之方法，其係包含以下之方法：

1')以含有具類固醇骨架之界面活性劑、及對維他命D為親和性物質的反應液來處理樣品；及

2')檢測處理後之樣品中之維他命D。

[9]如[1]至[7]中任一項之方法，其係包含以下之方法：

1'')以含有變性劑之前處理劑的反應液來處理樣品；

2'')將經上述1'')處理過之樣品，以含有具類固醇骨架之界面活性劑的稀釋液處理；以及

3'')檢測經上述2'')處理過之樣品中之維他命D。

[10]如[1]至[9]中任一項之方法，其中，樣品係來自人的樣品。

[11]如[1]至[10]中任一項之方法，其中，樣品係血液相關樣品。

[12]一種維他命D之測定用套組，其係包含以下：

1)具有類固醇骨架之界面活性劑；以及

2)對維他命D為親和性物質及/或維他命D標準品。

[發明之效果]

【0007】本發明之方法，有用於維他命D之測定。藉由本發明，可迅速且簡便地測定維他命D。

本發明之套組，例如，有用於簡便地實施本發明之方法。

【圖式簡單說明】

【0008】

第1圖係顯示以去氧膽酸鈉進行血清樣品之處理所得的測定值、與以Diasorin RIA法所得的測定值之高相關

性 ($R^2=0.8993$)之圖。

第2圖係顯示以有機溶劑進行血清樣品之處理所得的測定值、與以 Diasorin RIA法所得的測定值之低相關性 ($R^2=0.8327$)之圖。

第3圖係顯示以含有去氧膽酸鈉、SD及抗體之反應進行血清樣品之處理所得的測定值、與以 Diasorin RIA法所得的測定值之高相關性 ($R^2=0.9881$)之圖。

第4圖係顯示將人血清樣品藉由凝膠過濾層析法於對照緩衝液 (Tris-HCl) 中洗提時之含有 25OH 維他命 D 劃分之圖。DCNa：去氧膽酸鈉 (以下相同)。

第5圖係顯示以西方墨點法 (Western blotting) 之含有維他命 D 結合蛋白質劃分之圖。

第6圖係顯示藉由凝膠過濾層析法之去氧膽酸鈉溶液中之人血清維他命 D 及游離維他命 D 之洗提劃分之圖。

第7圖係顯示來自維他命 D 結合蛋白質及 25OH 維他命 D 之複合體之 25OH 維他命 D₃ 的釋放出程度之圖。關於 1~4 之實驗條件，請參照表 8。

【實施方式】

[實施發明之形態]

【0009】(A. 維他命 D 之測定方法)

本發明係提供樣品中之維他命 D 之測定方法。

【0010】本發明之方法，係包含以下：

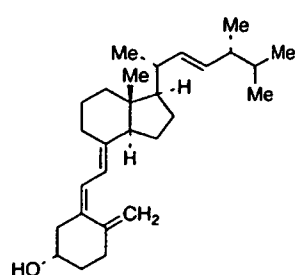
- 1) 以具有類固醇骨架之界面活性劑來處理樣品；及
- 2) 檢測處理後之樣品中之維他命 D。

【0011】(A-1. 步驟 1)

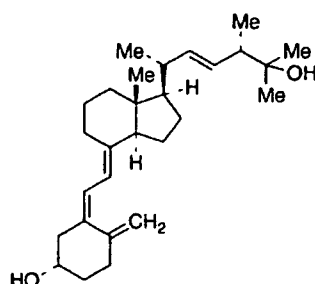
首先，以具有類固醇骨架之界面活性劑來處理樣品。

本發明之方法所使用之樣品，係含有、或疑似含有以下所示之維他命D或其代謝產物的樣品。作為維他命D之代謝產物，可列舉例如於維他命D加成有羥基之化合物、25OH維他命D2、25OH維他命D3、1,25(OH)₂維他命D2、1,25(OH)₂維他命D3。於本說明書中所使用時，用語「維他命D」，若無特別指定，係包含維他命D2及維他命D3、及類似維他命D2及維他命D3之藥物、以及該等之代謝產物。

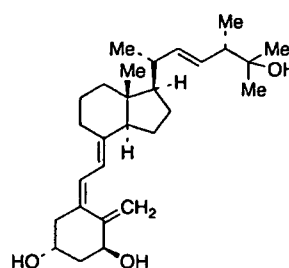
【0012】



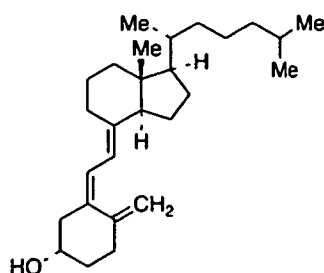
維他命D2



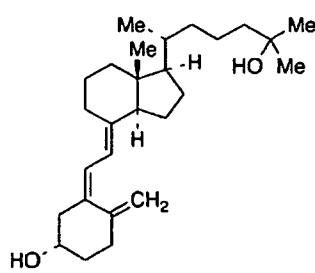
25OH維他命D2



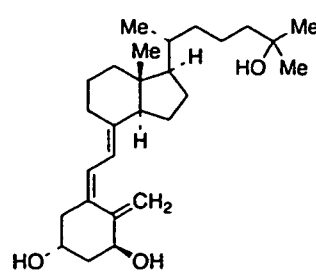
1,25(OH)₂維他命D2



維他命D3



25OH維他命D3



1,25(OH)₂維他命D3

【0013】樣品的由來並無特別限定，可為來自生物之生物學樣品，亦可為環境樣品。作為生物學樣品之來源

生物，可列舉例如哺乳動物(例如，人、猴子、老鼠、大鼠、兔子、牛、豬、馬、山羊、綿羊)、鳥類(例如，雞)等之動物、昆蟲、微生物、植物、菌類、魚類，較佳為哺乳動物、菌類、魚類，更佳為哺乳動物，更較佳為人。生物學樣品可為血液本身或來自血液之樣品的血液相關樣品(例如，全血、血清、血漿)、唾液、尿、乳汁、組織或細胞萃取液、或是該等之混合物，但較佳為血液相關樣品。作為環境樣品，可列舉來自土壤、海水、淡水之樣品。

【0014】本發明之方法所使用之樣品，較佳為，含有維他命D及對其具有結合能之分子之複合體的樣品。本發明之方法，係具有即使於樣品中存在有對維他命D具有強結合能之分子(例如，蛋白質)時，亦可正確地測定維他命D之優點。例如，已知維他命D係與存在於血清中之DBP強固地結合，而其解離常數 $K_d=5 \times 10^{-8}$ 曾被報告(參照專利文獻4)，但藉由本發明之方法，即使是具有如此強的結合能之蛋白質存在於樣品中的情形，亦可正確地測定樣品中之維他命D。因此，認為即使是對維他命D具結合能之DBP以外的分子(例如，潛在地對維他命D具有結合能之分子)存在於樣品中的情形，亦可藉由本發明而正確地測定維他命D。作為對維他命D具結合能之其他分子，可列舉例如白蛋白、脂質。具體而言，作為含有維他命D及對其具有結合能之分子之複合體的樣品，可列舉例如血液相關樣品(例如，全血、血清、血漿)。

【0015】藉由本發明之方法，則無拘於對維他命D具

有結合能之分子於樣品中之有無及該分子的種類、以及樣品的種類，皆可測定樣品中之維他命D。亦即，本發明之方法，不需於事前確認關於該等事項的資訊，或者，即使是具有對維他命D之結合能之未知的分子存在於樣品中的情形，亦可測定樣品中之維他命D。因此，本發明之方法，可作為能夠泛用於維他命D之測定的標準方法。

【0016】本發明之方法，樣品，在以具有膽固醇骨架之界面活性劑來進行處理之前，亦可進行其他處理。作為如此之處理，可列舉離心、萃取、過濾、沉澱、加熱、冷凍、冷藏、攪拌。

【0017】應以具有膽固醇骨架之界面活性劑來處理之樣品的容量，只要能夠進行維他命D之測定，則無特別限定，但例如為 $0.1 \sim 1000 \mu\text{l}$ ，較佳為 $0.5 \sim 100 \mu\text{l}$ ，更佳為 $1 \sim 50 \mu\text{l}$ 。

【0018】具有膽固醇骨架之界面活性劑，係將膽固醇骨架作為獨立之環狀構造(亦即，未與其他環縮合之膽固醇骨架)而含有之化合物、或其鹽。於具有膽固醇骨架之界面活性劑中，其5位之立體構造可為 α 、亦可為 β 。

【0019】具有膽固醇骨架之界面活性劑，可為具有作為疏水性部分之膽固醇骨架、及親水性部分的化合物、或其鹽。作為親水性部分，可列舉例如，陰離子性部分(例如，磺酸鹽($-\text{SO}_3^-$)、碳酸鹽($-\text{COO}^-$)、及膦酸鹽($-\text{POO}_2^-$))、陽離子性部分(例如，亦可以1~4個烴基取代之4級銨及4級膦)、非離子性親水性部分(例如，複數之醚)及具有該等之基(例如，具有如此之親水性部分之烴基)。因此

，具有膽固醇骨架之界面活性劑，視親水性部分的種類，可為陰離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑、兩性界面活性劑或非離子性界面活性劑。作為上述之烴基，可列舉例如，甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、二級丁基、三級丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十二基(月桂基)、十四基(肉豆蔻基)、十六基(鯨蠟基)、十七基、十八基(硬脂醯基)、環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基、環壬基、環癸基、苯基、及萘基。烴基，烴基係較佳為碳原子數1~10之烴基，更佳為碳原子數1~6之烷基。

【0020】膽固醇骨架，除親水性部分之外，亦可具有1~6個(較佳為1、2、3或4個)取代基。作為如此之取代基，只要是不大幅損害膽固醇骨架之性質(例如，疏水性)者，則無特別限定，但可列舉例如，碳原子數1~10之烴基、羥基、以碳原子數1~10之烴基取代之羥基(例如，烷基氧基)、碳原子數1~10之烴基-羰基-氧基(例如，烷基-羰基-氧基)、側氧基、甲醯基、碳原子數1~10之烴基-氧基-羰基(例如，烷基氧基-羰基)、鹵素原子(例如，氟原子、氯原子、溴原子、碘原子)、及氰基。

【0021】本說明書中所使用之用語「鹽」，係為任意之鹽，可列舉例如，無機鹽、有機鹽及分子內鹽。作為無機鹽，可列舉例如，金屬鹽、鹵化物鹽、酸加成鹽、及銨鹽。作為金屬鹽，可列舉例如，鹼金屬(例如，鋰、鈉、鉀)之鹽、鹼土族金屬(例如，鎂、鈣)之鹽。作為鹵化物鹽中之鹵素，可列舉例如氟、溴、氯、及碘。作為

無機鹽之酸加成鹽，可列舉例如，與鹽酸、硝酸、硫酸等無機酸之鹽。作為有機鹽，可列舉例如，與三甲胺、三乙胺、吡啶等有機鹼之鹽、以及與草酸等有機酸之鹽。

【0022】較佳為，具有膽固醇骨架之界面活性劑係膽汁酸或其衍生物或是該等之鹽。作為膽汁酸，可列舉例如，去氧膽酸、鵝去氧膽酸(chenodeoxycholic acid)、熊去氧膽酸(ursodeoxycholic acid)、去氧豬膽酸(hyodeoxycholic acid)、膽酸、甘膽酸(glycocholic acid)、牛膽酸(taurocholic acid)、豬膽酸(hyocholeic acid)、5 α -鯉膽醇(cyprinol)、石膽酸(lithocholic acid)、牛去氧膽酸(taurodeoxycholic acid)、及牛膽酸。作為膽汁酸之衍生物，可列舉例如，CHAPS、BIGCHAP、及去氧BIGCHAP。

【0023】更佳為，具有膽固醇骨架之界面活性劑，亦可具有於7位不具羥基之類固醇骨架。作為具有於7位不具羥基之類固醇骨架的界面活性劑，可列舉例如，具有於7位具有羥基以外之基(例如，羥基除外之上述取代基)之膽固醇骨架的界面活性劑、及具有於7位不具取代基(換言之，7位之碳原子係與氫原子鍵結)之膽固醇骨架的界面活性劑。特佳為，具有於7位不具羥基之膽固醇骨架的界面活性劑、及具有於7位不具取代基之膽固醇骨架的界面活性劑。作為具有於7位不具取代基之膽固醇骨架的界面活性劑，可列舉例如，去氧膽酸、牛去氧膽酸、石膽酸、及5 α -鯉膽醇、以及該等之鹽。

【0024】樣品之處理，可使用1種或複數種(例如，2或3種)上述界面活性劑來進行。上述界面活性劑的濃度，只要是對於測定維他命D為有效的濃度則無特別限定，可適當地加以調整，但例如，可為0.001%(w/v)～10%(w/v)%。

具體而言，藉由具有膽固醇骨架的界面活性劑來處理樣品時之該界面活性劑的濃度，在藉由如後述之使用反應液之方法來處理樣品的情形，只要是在反應液與樣品之混合液中可發揮其作用之濃度，則無特別限定，但例如，可為0.001%(w/v)～5%(w/v)%。於該場合，具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，較佳為0.005%(w/v)以上，更佳為0.01%(w/v)以上，更較佳為0.02%(w/v)以上。具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，又可較佳為1%(w/v)以下，更佳為0.8%(w/v)以下，更較佳為0.6%(w/v)以下，特佳為0.5%(w/v)以下。當使用複數之界面活性劑時，各界面活性劑的濃度，亦如上述。

又，以具有膽固醇骨架之界面活性劑來處理樣品時之該界面活性劑的濃度，在藉由如後述之使用前處理液之方法來處理樣品的情形，只要是在前處理液與樣品之混合液中可發揮其作用之濃度，則無特別限定，但例如，可為0.001%(w/v)～10%(w/v)%。於該場合，具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，較佳為0.005%(w/v)以上，更佳為0.01%(w/v)以上，更較佳為0.02%(w/v)以上。具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，又可較佳為1%(w/v)以下，更佳為0.8%(w/v)以下，更較佳為0.6%(w/v)以下，

特佳爲0.5%(w/v)以下。當使用複數之界面活性劑時，各界面活性劑的濃度，亦如上述。

再者，以具有膽固醇骨架之界面活性劑來處理樣品時之該界面活性劑的濃度，在藉由如後述之使用前處理液及稀釋液之方法來處理樣品的情形，只要是在前處理液、稀釋液及樣品之混合液中可發揮其作用之濃度，則無特別限定，但例如，可爲0.001%(w/v)~10%(w/v)%。於該情形，具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，較佳爲0.005%(w/v)以上，更佳爲0.01%(w/v)以上，更較佳爲0.02%(w/v)以上。具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，又可較佳爲1%(w/v)以下，更佳爲0.8%(w/v)以下，更較佳爲0.6%(w/v)以下，特佳爲0.5%(w/v)以下。當使用複數之界面活性劑時，各界面活性劑的濃度，亦如上述。

【0025】於一實施形態，樣品之處理，除了具有膽固醇骨架的界面活性劑之外，亦可併用與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑來進行。因此，本發明之方法，亦可進一步包含以其他變性劑來進行處理。藉由具有膽固醇骨架之界面活性劑及其他變性劑之樣品的處理，可同時或分別進行，而較佳爲同時進行。作爲如此之變性劑，可列舉例如，界面活性劑(陰離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑、兩性界面活性劑或非離子性界面活性劑)、離散劑(chaotropic agent)、還原劑。變性劑係可爲1種，但亦可爲複數(例如，2或3種)。如此之變性劑，係可以爲了變性作用而以有效的濃度來使用，但亦可以期待變性作用以外之作用，而以對於變性作用

以外之作用有效的濃度來使用。例如，以其他變性劑來處理樣品時之其他變性劑的濃度，亦可與具有膽固醇骨架之界面活性劑的上述濃度相同。

【0026】作為與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑的陰離子界面活性劑，可列舉例如，己基硫酸、辛基硫酸、癸基硫酸、十二烷基硫酸、十四烷基硫酸、十六烷基硫酸、十二烷基磷酸、十二烷基苯磺酸、正月桂醯基肌胺酸、及正十二醯基肌胺酸、以及該等之鹽(例如，鈉鹽等上述之鹽)。

【0027】作為與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑的陽離子界面活性劑，可列舉例如，4級銨化合物及4級磷化合物(例如，以1~4個如上述之烴基取代者)、以及該等之鹽(例如，鹵化物)。作為陽離子界面活性劑之具體例，可列舉例如，十六烷基二甲基乙基銨、十六烷基三甲基銨、十六烷基三甲基銨、及肉豆蔻基三甲基銨、以及該等之鹵化物(例如，溴化物)。

【0028】作為與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑的兩性界面活性劑，可列舉例如，Zwittergent、ASB-14、ASB-14-4、C7Bz0、EMPIGEN BB界面活性劑、3-N(N,N-二甲基辛基銨基)丙烷磺酸、3-n(N,N-二甲基辛基銨基)丙烷磺酸、3-(癸基二甲基銨基)丙烷磺酸鹽酸、N-十二烷基N,N-二甲基-3銨基-1丙烷磺酸、3-(N,N-二甲基肉豆蔻基銨基)丙烷磺酸、3-(N,N-二甲基棕櫚基銨基)丙烷磺酸、及3-(N,N-二甲基十八烷基銨基)丙烷磺酸、以及該等之鹽(例如，分子內鹽等之上述之鹽)。

【0029】作為與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑的非離子性界面活性劑，可列舉例如，Brij35、Brij56、來自皂皮樹屬之皂素、TritonX-405、TritonX-N101、TritonX-100、TritonX-705-70、TritonX-305、Tween-20、Tween-40、Tween-60、Tween-80、MEGA-8、MEGA-10、NP40。

【0030】作為與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑的離散劑，可列舉例如，胍、尿素、及硫代硫酸、以及該等之鹽(例如，鹽酸鹽等酸加成鹽及鉀鹽等金屬鹽等上述之鹽)。

【0031】作為與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑的還原劑，可列舉例如，二硫蘇糖醇(DTT)、二硫赤癬醇(DTE)、2-巯基乙基胺(2MEA)、2-巯基乙醇(2ME)、三-2-羧基乙基磷鹽酸鹽(TCEP-HCl)、L-半胱胺酸、N-乙醯基-L-半胱胺酸、抗壞血酸。

【0032】於較佳之實施形態，與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他變性劑，係含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑(包含鹽)。

【0033】於其他變性劑中，疏水性部分，係由烴鏈所構成。烴鏈，係直鏈或分支鏈之烴基，烴基中之碳原子數通常為8～60個。含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑，只要具有至少1個如此之烴鏈即可。烴鏈中之碳原子數，較佳為10個以上。烴鏈中之碳原子數，又，從合成或取得容易的觀點，較佳為40個以下，更佳為30個以下，更較佳為20個以下。烴鏈中之

碳原子數，特佳為10或11個。

作為直鏈之烴基，可列舉例如，直鏈之飽和烴基的烷基、以及直鏈之不飽合烴基(例如，烯基及炔基)。作為碳原子數8~60個之烷基，可列舉例如，辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基。作為碳原子數8~60個之直鏈之不飽合烴基，可列舉例如，於上述之烷基中含有1~4個(較佳為1或2個)不飽合鍵(雙鍵或三鍵)部分者。

作為分支鏈之烴基，可列舉例如，上述之直鏈之飽和或不飽和烴基上之氫原子，以1~4個(較佳為1或2個)碳原子數1~10之烴基所取代者。作為碳原子數1~10之烴基，可列舉例如，甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、二級丁基、三級丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基、環壬基、環癸基、苯基、萘基。

構成疏水性部分之烴鏈，較佳為直鏈之飽合烴基，更佳為具有10或11個碳原子數之直鏈的飽合烴基。

【0034】其他變性劑，作為親水性部分，可列舉例如，陰離子性親水性部分及陽離子性親水性部分。含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑，可具有1或2種以上之親水性部分，亦可具有陰離子性親水性部分及陽離子性親水性部分兩者。作為陰離子性親水性部分，可列舉例如，磺酸鹽基($-\text{SO}_3^-$)、碳酸鹽基($-\text{COO}^-$)、及膦酸鹽基($-\text{POO}_2^-$)。作為陽離子性親水性部

分，可列舉例如銨基(N^+)、及磷基(P^+)。親水性部分，較佳為磺酸鹽基($-SO_3^-$)、碳酸鹽基($-COO^-$)、銨基(N^+)、或磷基(P^+)，更佳為磺酸鹽基($-SO_3^-$)、碳酸鹽基($-COO^-$)、或銨基(N^+)，更較佳為磺酸鹽基($-SO_3^-$)、或碳酸鹽基($-COO^-$)，特佳為磺酸鹽基($-SO_3^-$)。

【0035】含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑，除由烴鏈所構成之疏水性部分及親水性部分之外，亦可含有其他部分(例如，疏水性部分與親水性部分之間)。作為如此之其他部分，可列舉例如，環狀基(例如，環烷基、芳基、雜環基)、及非環狀基(例如，胺基、羰基、羰基胺基)。

【0036】具體而言，作為含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑，可列舉例如，己基硫酸、辛基硫酸、癸基硫酸、十二烷基硫酸、十四烷基硫酸、十六烷基硫酸、十二烷基磷酸、十二烷基苯磺酸、正月桂醯基肌胺酸、及正十二醯基肌胺酸、以及該等之鹽。

【0037】樣品之處理，亦可使用1種或複數種(例如，2或3種)之其他變性劑來進行。其他變性劑之濃度，只要是對於維他命D之測定為有效的濃度，則無特別限定，可適當地加以調整。例如，在使用含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑作為其他變性劑的情形，該界面活性劑的濃度，例如，可為0.001%(w/v)～10%(w/v)。

具體而言，以含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及

親水性部分的界面活性劑來處理樣品時之該界面活性劑的濃度，在藉由如後述之使用反應液之方法來處理樣品的情形，只要是在反應液與樣品之混合液中可發揮其作用之濃度，則無特別限定，例如，可為0.005%(w/v)～5%(w/v)%。於該場合，含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑之濃度，較佳為0.01%(w/v)以上，更佳為0.02%(w/v)以上。含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑之濃度，又可較佳為1%(w/v)以下，更佳為0.8%(w/v)以下，更較佳為0.6%(w/v)，特佳為0.5%(w/v)以下。當使用複數之界面活性劑時，各界面活性劑之濃度亦如上述。

又，以含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑來處理樣品時之該界面活性劑的濃度，在藉由如後述之使用前處理液之方法來處理樣品的情形，只要是在前處理液與樣品之混合液中可發揮其作用之濃度，則無特別限定，例如，可為0.001%(w/v)～10%(w/v)%。於該場合，含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑之濃度，較佳為0.001%(w/v)以上，更佳為0.02%(w/v)以上，更較佳為0.03%(w/v)以上。含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑之濃度，又可較佳為1%(w/v)以下，更佳為0.8%(w/v)以下，更較佳為0.6%(w/v)以下，特佳為0.5%(w/v)以下。當使用複數之界面活性劑時，各界面活性劑的濃度亦如上述。

【0038】樣品之處理，又，亦可於其他成分的存在下

進行。作為如此之成分，可列舉例如，對維他命D為親和性物質、白蛋白(例如，牛血清白蛋白、人血清白蛋白)、明膠、及脫脂乳。

【0039】所謂對維他命D為親和性物質，係指具有結合於維他命D之能力的物質，可列舉例如，對維他命D之抗體、適配體(aptamer)。抗體，可為多株抗體(polyclonal antibody)、或單株抗體之任一者。抗體，又，亦可為抗體之片段(例如，Fab、F(ab')₂)、重組抗體(例如，scFv)。抗體，再者，亦可為藉由噬菌體顯示等之分子生物學方法、及/或利用既存之蛋白質模體以蛋白質工學方法所製作之類抗體分子(antibody-like molecule)(例如，affibody、anticalin、DARPin、monobody)。

【0040】樣品之處理，係包含例如(a)將樣品與含有如上述成分之水溶液(例如，緩衝液)混合而調製成混合液；及(b)培養混合液。

【0041】作為緩衝液，可列舉例如，Tris緩衝液(例如Tris-HCl緩衝液、TE緩衝液、TAE緩衝液、TBE緩衝液、Tris緩衝生理食鹽水)、磷酸緩衝液(例如磷酸緩衝生理食鹽水)、碳酸緩衝液(例如，碳酸-重碳酸鈉緩衝液)、GOOD緩衝液(例如，MES、ADA、PIPES、ACES、膽胺鹽酸、BES、TES、HEPES、乙醯胺甘胺酸、三羥甲基甘胺酸、甘胺酸醯胺、二羥乙甘胺酸)。樣品之處理，可於中性條件下或酸性或鹼性條件下進行，但較佳為於中性條件下進行。因此，樣品之處理中所採用之pH值係例如為4.0～9.5，較佳為5.0～9.0，更佳為5.5～8.5，更較佳為6.0

～8.0。樣品之處理中之pH的調整，可利用緩衝液、酸性物質及鹼性物質來進行。

【0042】樣品之處理(例如，上述(a)(b)之步驟)的溫度，只要是適於具有膽固醇骨架之界面活性劑等之成分發揮其作用，則無特別限定，但例如為15～60℃，較佳為20～50℃，更佳為20～45℃。(a)中的混合液之調製所需要的時間，通常為30秒以下，較佳為20秒以下，更佳為15秒以下，更較佳為10秒以下。(b)中的培養時間，例如為60分鐘以下，較佳為30分鐘以下，更佳為10分鐘以下。由縮短用於測定之處理時間的觀點，培養時間亦可更較佳為5分鐘以下，特佳為3分鐘以下、2分鐘以下、1分鐘以下、50秒以下、40秒以下、30秒以下、20秒以下、15秒以下、10秒以下或5秒以下。因此，由縮短用於測定之處理時間的觀點，樣品之處理時間(例如，上述(a)(b)之合計時間)，可為3分鐘以下、2分鐘以下、1分鐘以下、50秒以下、40秒以下、30秒以下或15秒以下。

【0043】樣品之處理，又，可僅以混合來進行，所謂「僅以混合」來進行樣品之處理，係指樣品之處理係以上述(a)來進行，而不進行上述(b)(亦即，不需培養)之意。由所謂迅速且簡便地測定的觀點，亦可僅以混合來進行樣品的處理。

【0044】(A-1-1.反應液之使用)

於較佳實施形態，上述步驟1)可藉由以含有具膽固醇骨架之界面活性劑及對維他命D為親和性物質之反應液來處理樣品而進行。

【0045】反應液係含有具膽固醇骨架之界面活性劑及對維他命D為親和性物質。反應液，又，亦可含有1種或複數(例如，2或3種以上)與具有膽固醇骨架之界面活性劑不同之其他界面活性劑(例如，陰離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑、兩性界面活性劑或非離子性界面活性劑)、離散劑、及還原劑、以及含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑等如上述之其他成分。

【0046】反應液中之含有具膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，只要是在反應液與樣品的混合物中可發揮其作用之濃度，則無特別限定，但例如，可於反應液與樣品的混合液中達成如上述之濃度(以具有膽固醇骨架之界面活性劑來處理樣品時之具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度)的濃度。因此，反應液中之具有膽固醇骨架的界面活性劑之濃度，可根據樣品及反應液的容量，而適當設定為達成如上述之濃度。

【0047】反應液係於水溶液(例如，如上述之緩衝液)含有如上述之物質。反應液可為中性溶液或是酸性溶液或鹼性溶液，但較佳為中性溶液。因此，反應液之pH值係例如為4.0~9.5，較佳為5.0~9.0，更佳為5.5~8.5，更較佳為6.0~8.0。

【0048】反應液之容量係可視樣品之容量及種類、以及分析之目的(例如，定性或定量之測定)等，而適當地決定，但相對於樣品之容量，例如為0.1~100倍，較佳為0.5~50倍，更佳為1~10倍。

【0049】藉由反應液之樣品的處理，係能夠以適當的樣式適當地進行，而發揮反應液中所含之具有膽固醇骨架的界面活性劑等成分之作用。例如，藉由反應液之樣品的處理，可與如上述之樣品的處理同樣地進行，亦可包含(a1)將樣品與反應液混合而調製混合液、及(b1)培養混合液。(a1)及(b1)中之溫度及時間的條件，係分別與上述(a)及(b)中之上述者相同。

【0050】(A-1-2.前處理液及稀釋液之使用)

於其他之較佳實施形態，上述步驟1)可藉由i)以含變性劑之前處理液來處理樣品、及ii)將經前處理液處理的樣品，以含有具膽固醇骨架的界面活性劑之稀釋液來處理而進行。

【0051】(步驟i)

前處理液係包含變性劑。作為變性劑，可列舉例如，具有膽固醇骨架之界面活性劑、以及與具有膽固醇骨架之界面活性劑不同的其他界面活性劑(例如，陰離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑、兩性界面活性劑或非離子性界面活性劑)、離散劑、及還原劑。前處理液所含之變性劑，可為1種、亦可為複數(例如，2或3種)。前處理液亦可含有與稀釋液所含之界面活性劑同種之1或2個以上(例如，1~3個)的界面活性劑(例如，具有膽固醇骨架之界面活性劑及其他界面活性劑)來作為變性劑。前處理液，又，亦可含有如上述之其他成分。

【0052】前處理液中之具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，只要是在前處理液與樣品的混合液中可發揮其

作用之濃度，則無特別限定，但例如可於前處理液與樣品的混合液中達成上述之濃度(以具有膽固醇骨架之界面活性劑來處理樣品時之具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度)的濃度。因此，前處理液中之具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度，可根據樣品及前處理液的容量，而適當設定為能達成如上述之濃度。

【0053】前處理液係於水溶液(例如，如上述之緩衝液)含有上述之物質。前處理液可為中性溶液或是酸性溶液或鹼性溶液，但較佳為中性溶液。因此，前處理液之pH值係例如為4.0～9.5，較佳為5.0～9.0，更佳為5.5～8.5，更較佳為6.0～8.0。

【0054】前處理液之容量，可視樣品之容量及種類、以及分析之目的(例如，定性或定量之測定)等而適當地決定，但相對於樣品之容量係例如為0.5～100倍，較佳為1～10倍，更佳為1～5倍。

【0055】藉由前處理液之樣品的處理係以適當的樣式適當地進行，來發揮前處理液中所含成分之作用。例如，藉由前處理液之樣品的處理，可與如上述之樣品的處理同樣地進行，亦可包含(a2-1)將樣品與前處理液混合而調製第1混合液、及(b2-1)培養第1混合液。(a2-1)及(b2-1)中之溫度及時間的條件，分別係與上述(a)及(b)中之上述者相同。藉由前處理液之樣品的處理，又，亦可如上述僅以混合來進行。

【0056】(步驟ii)

稀釋液係含有具膽固醇骨架之界面活性劑。於本發

明之方法，係藉由使用含有具膽固醇骨架之界面活性劑的稀釋液，而可提升維他命D之檢測感度。稀釋液，又，亦可含有1種或複數(例如，2或3種以上)與具有膽固醇骨架的界面活性劑不同之其他界面活性劑(例如，陰離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑、兩性界面活性劑或非離子性界面活性劑)、離散劑、及還原劑等之其他成分。稀釋液，又，亦可含有如上述之其他成分(例如，對維他命D為親和性物質、白蛋白)。

【0057】稀釋液中之具有膽固醇骨架的界面活性劑之濃度，只要是在前處理液、稀釋液及樣品的混合液中可發揮其作用之濃度，則無特別限定，例如可在前處理液、稀釋液及樣品的混合液中達成如上述之濃度(以具有膽固醇骨架之界面活性劑來處理樣品時之具有膽固醇骨架之界面活性劑的濃度)的濃度。因此，稀釋液中之具有膽固醇骨架的界面活性劑之濃度係可根據樣品、前處理液及稀釋液的容量，而適當設定為如達成上述之濃度。

【0058】稀釋液係於水溶液(例如，如上述之緩衝液)含有上述之物質。前處理液，可為中性溶液或是酸性溶液或鹼性溶液，但較佳為中性溶液。因此，前處理液之pH值係例如為4.0～9.5，較佳為5.0～9.0，更佳為5.5～8.5，更較佳為6.0～8.0。

【0059】稀釋液之容量，可視樣品及前處理液之容量及種類、以及分析之目的(例如，定性或定量之測定)等來適當地決定，但可於較樣品及前處理液之總容量多的容量中使用。具體而言，稀釋液之容量，相對於樣品及

前處理液之總容量係例如為1~20倍，較佳為1~10倍，更佳為1~5倍。

【0060】藉由稀釋液之樣品的處理係以適當的樣式適當地進行，來能發揮稀釋液中所含成分之作用。例如，藉由稀釋液之樣品的處理，可與藉由前處理液之樣品的處理同樣地進行，亦可包含(a2-2)將經前處理液處理之樣品與稀釋液混合而調製第2混合液、及(b2-2)培養第2混合液。(a2-2)及(b2-2)中之溫度及時間之條件，分別係與上述(a)及(b)中之上述者相同。

【0061】(A-2.步驟2)

於經如上述處理之樣品中，會檢測出維他命D。維他命D之檢測，係定性或定量地進行。於本步驟，當使用上述之親和性物質時，亦可包含將親和性物質添加至經處理之樣品。

【0062】維他命D之檢測，可藉任意之方法進行，例如可利用對維他命D為親和性物質來進行。維他命D之檢測，又，亦可藉免疫學方法來進行。作為如此之免疫學方法，可列舉例如，酵素免疫分析法(EIA)(例如，直接競爭ELISA、間接競爭ELISA、三明治ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、螢光免疫分析法(FIA)、磁粒子法、免疫層析法、發光免疫分析法、自旋免疫法、乳膠凝集法。作為可進行維他命D檢測之上述以外的方法，可列舉例如，LC-MS。

【0063】當使用抗體作為對維他命D為親和性物質時，亦可進一步使用二級抗體。作為二級抗體，可為對於

對維他命D之抗體(初級抗體)的初級抗體部分之抗體，亦可為對維他命D及初級抗體的複合體之抗體。二級抗體等抗體，亦可連結於檢測用物質。作為檢測用物質，可列舉例如，酵素(例如，山葵過氧化酶、鹼性磷酸酶)、親和性物質(例如，鏈黴親和素(streptavidin)、生物素)、螢光物質(例如，螢光素(fluorescein)、異硫氰酸螢光素、玫瑰紅)、發光物質(例如，螢光素(luciferin)、水母素(aequorin))、放射性物質(例如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I)。二級抗體等之抗體，抗體亦可被固定於支持體。作為支持體，可列舉例如，粒子(例如磁粒子)、膜(例如硝化纖維素膜)、玻璃、塑膠、金屬、薄板(例如多孔板盤)、裝置。抗體，又，亦可以含浸於濾紙等之介質的形態提供。

【0064】(B.維他命D之測定用套組)

本發明，又提供維他命D之測定用套組。

【0065】本發明之套組係包含以下：

- 1)具有類固醇骨架之界面活性劑；以及
- 2)對維他命D為親和性物質及/或維他命D標準品。

當對維他命D為親和性物質為初級抗體時，本發明之套組亦可進一步包含二級抗體。

【0066】於較佳之實施形態，本發明之套組係包含含有具膽固醇骨架之界面活性劑及對維他命D為親和性物質的反應液。

【0067】於其他之較佳實施形態，本發明之套組係包含以下：

- 1)含有變性劑之前處理液；
- 2)含有具膽固醇骨架的界面活性劑之稀釋液；以及
- 3)對維他命D為親和性物質及/或維他命D標準品。

【0068】本發明之套組所含之上述構成成分之詳細(例如，有效成分及濃度、較佳例)，係如本發明之方法中所述。反應液、以及前處理液及稀釋液，亦可進一步含有如本發明之方法中所述之成分及/或物質。維他命D標準品，係含有既定濃度(單一或複數)之維他命D之水溶液或維他命D之粉末，有用於作為對照組。

【0069】於本發明之套組，各構成成分能夠以分別被收納於不同容器(例如，管、盤)的形態來提供。或者，本發明之套組，亦能夠以裝置的形態來提供。具體而言，亦能夠以構成成分的全部被收納於裝置中的形態來提供。或者，亦能夠以構成成分的一部分被收納於裝置中的形態來提供、而剩餘部分以未收納於裝置之形態(例如，收納於不同容器的形態)來提供。於該場合，未收納於裝置之構成成分，於測定標的物質之際，可藉由注入裝置中而被使用。作為裝置之構造，可列舉例如，1)具備有用於混合樣品與具有膽固醇骨架之界面活性劑而調製混合液的第1區域、及用於使所調製之混合液與對維他命D為親和性物質接觸而檢測出維他命D的第2區域之裝置；2)具備有混合樣品、具有膽固醇骨架之界面活性劑及對維他命D為親和性物質而檢測出維他命D之區域的裝置；以及3)具備有可混合樣品與上述構成成分(例如，反應液、以及前處理液及稀釋液)之通路、及用於檢測維他

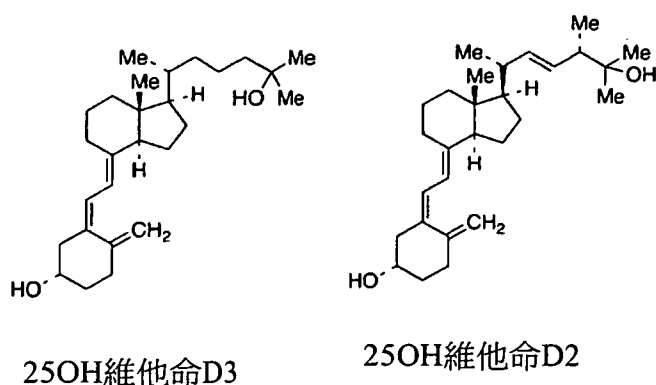
命 D 之區域的裝置。

【0070】以下，記載本發明之實施例，但本發明並不受限於該等實施例。

[實施例]

【0071】於以下之實施例，作為測定維他命 D 之免疫學方法，係使用辨識 25OH 維他命 D2 及 25OH 維他命 D3 (以下，視需要將 25OH 維他命 D2 及 25OH 維他命 D3 統稱為 25OH 維他命 D) 的初級抗體。因此，以下之實施例所測定之值，係可對應 25OH 維他命 D2 及 25OH 維他命 D3 總量。

【0072】



【0073】實施例 1：經界面活性劑處理的樣品中之 25OH 維他命 D 的測定

併用含界面活性劑之前處理液、及含界面活性劑或有機溶劑(乙醇)之稀釋液，經時地處理人血清，接著，藉由免疫學方法測定人血清中的 25OH 維他命 D。

【0074】方法，係如以下方式進行。

1) 於由同一人所採取之同一血清(10 μ l)，加入 4 倍量(40 μ l)之各種前處理液[0.3%(w/v)SDS/0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.6)+0.1%(w/v)下述界面活性劑]，而調製血清與

前處理液之第1混合液(50 μ l)。第1混合液中之各成分的濃度係如以下：0.24%(w/v)SDS/0.1M Tris-HCl緩衝液+0.08%(w/v)下述界面活性劑。

2)將第1混合液，於室溫(25℃)培養10分鐘。

3)於培養後之第1混合液，加入3倍量(150 μ l)之各種稀釋液[0.1%(w/v)BSA/0.1M Tris緩衝液(pH7.6)、0.1%(w/v)下述界面活性劑或10%(v/v)乙醇]，而調製第1混合液與稀釋液之第2混合液(200 μ l)。第2混合液中之下述界面活性劑的濃度為0.095%(w/v)。

4)等量混合第2混合液與抗25OH維他命D抗體結合磁粒子液。

5)將上述4)所得之溶液，於37℃培養10分鐘。

6)培養後，於磁性盤上收集樣品中之磁粒子，並3次洗淨磁粒子。

7)於除去洗淨液之磁粒子，加入鹼性磷酸酶標識抗體(對25OH維他命D及抗25OH維他命D抗體的免疫複合體之抗體)溶液。

8)將上述7)所得之溶液，於37℃培養10分鐘。

9)培養後，於磁性盤上收集樣品中之磁粒子，並3次洗淨磁粒子。

10)於含磁粒子之溶液，加入發色基質(AMPPD)。

11)將上述10)所得之溶液，於37℃培養5分鐘。

12)以label reader(ARVO；Perkin Elmer)測定發光數。

【0075】結果係如以下之表1所示。又，於表1，係將

不含界面活性劑之前處理液及不含界面活性劑之稀釋液兩者所處理之人血清的發光數設為100，而將各種條件下所測定之發光數，以相對於對照組的百分率表示。

【0076】[表 1]

表1.併用含界面活性劑之前處理液、及含界面活性劑或有機溶劑(乙醇)之稀釋液，經時地處理後之人血清中的25OH維他命D之測定中之發光數的比較

前處理液中 之各種界面 活性劑	稀釋液中之界面活性劑或有機溶劑							
		NP40	Tween 20	皂素	CHAPS	DC Na	無	10%乙醇
	NP40	103	75	110	211	256	111	162
	Tween 20	102	70	94	194	217	96	
	CHAPS	125	91	137	270	323	132	
	DC Na	120	84	119	262	285	121	
	無	110	80	102	249	248	100	

NP40：壬基酚聚乙氧基乙醇(nonyl phenoxypolyethoxylethanol)

Tween 20：聚氧乙烯脫水山梨醇單月桂酸酯(polyoxyethylen(20)sor-bitanmonolaurate)

皂素：來自皂皮樹屬樹皮之皂素(SIGMA：S7900)

CHAPS：3-(3-膽醯胺基丙基)二甲基-1-丙烷磺酸內銨鹽

(3-(3-cholamidepropyl)dimethylammonio-1-propanesul phonate)

DC Na：去氧膽酸鈉(deoxycholate sodium)

【0077】其結果，確認了使用含有具膽固醇骨架的界面活性劑之CHAPS或去氧膽酸鈉(DC Na)的前處理液所測定之訊號強度(發光數)，係有較使用不具膽固醇骨架之界面活性劑(前處理液)所測定者為高的傾向(表1)。又，使用含有具膽固醇骨架的界面活性劑之CHAPS或去氧膽酸鈉(DC Na)的稀釋液所測定之訊號強度(發光數)，係顯著地較使用不具膽固醇骨架之界面活性劑及有機溶劑(稀釋液)所測定者高(表1)。因此，顯示了於維他命D之測定中，藉由使用含有具膽固醇骨架之界面活性劑的試藥，係可高感度地檢測標的物質，特別是，藉由使用含有具膽固醇骨架之界面活性劑的稀釋液，而可高感度地檢測標的物質。

【0078】實施例2：併用含有離散劑之前處理液、及含

有具膽固醇骨架的界面活性劑之稀釋液，經時地處理後之樣品中的25OH維他命D之測定

併用含離散劑之前處理液、及含界面活性劑或有機溶劑(乙醇)之稀釋液，經時地處理人血清，接著，藉由免疫學方法測定人血清中之25OH維他命D。

【0079】方法，係如以下方式進行。

1)於由同一人所採取之同一血清(10 μ l)，加入4倍量(40 μ l)之各種前處理液[7.5M胍鹽酸鹽/PB(磷酸緩衝液)(pH7.6)、0.1%(w/v)下述界面活性劑]，調製血清與前處理液之第1混合液(50 μ l)。第1混合液中之各成分的濃度，係如以下：6M胍鹽酸鹽；0.08%(w/v)下述界面活性劑。

2)將第1混合液，於室溫(25 $^{\circ}$ C)培養10分鐘。

3)於培養後之第1混合液，加入3倍量(150 μ l)之各種稀釋液[0.1%(w/v)BSA/0.1M Tris緩衝液(pH7.6)、0.1%(w/v)下述界面活性劑或10%(v/v)乙醇]，而調製第1混合液與稀釋液之第2混合液(200 μ l)。第2混合液中之下述界面活性劑的濃度為0.095%(w/v)。

4)之後的操作，係藉由與實施例1之4)~12)相同的方法進行。

【0080】結果係如以下之表2所示。又，於表2，係將含有離散劑(胍鹽酸鹽)且不含界面活性劑之前處理液、及不含界面活性劑之稀釋液兩者所處理之人血清的發光數設為100(對照組)，而將各種條件下所測定之發光數，以相對於對照組的百分率表示。

【0081】[表 2]

表2.併用含離散劑之前處理液、及含界面活性劑或有機溶劑(乙醇)之稀釋液，經時地處理後之人血清中的25OH維他命D之測定中之發光數的比較

前處理液中之主要成分		稀釋液中之界面活性劑			
		Tween 20	DC Na	無	10%乙醇
胍鹽酸鹽+ 各種界面活性劑	Tween	102	197	65	139
	DC Na	130	219	128	
	無	130	215	100	

簡稱係與表1相同。

【0082】如表 2 所示，即使是使用含有離散劑之前處理液的情形，使用含有去氧膽酸鈉之稀釋液所測定之訊號強度(發光數)，亦較使用含有有機溶劑或其他界面活性劑(Tween 20)之稀釋劑所測定者高。因此確認了，本發明之方法，並不無特別受限於前處理液之種類，而可高感度地檢測出標的物質。

【0083】實施例 3：藉由併用前處理液及稀釋液的本發明方法所得之標的物質的測定值、與藉由既存方法所得的測定值之相關係數的比較

爲了驗證藉由本發明方法之標的物質的測定精度，比較了藉由併用前處理液及稀釋液之本發明方法所得之標的物質的測定值、與藉由利用不同方法論之既存方法所得之測定值的相關係數。

【0084】3-1)藉由本發明方法之測定

方法，係以如下方式進行。又，作爲測定樣品，係使用人血清 14 樣品、木炭處理血清強化樣品 1 樣品之共計 15 樣品。

1)於血清(10 μ l)，加入 4 倍量(40 μ l)之各種前處理液[7.5M 胍鹽酸鹽及 4nM DTT/0.1M Tris 緩衝液(pH7.6)

+0.1%(w/v)去氧膽酸鈉、或5%(v/v)乙醇及5%(v/v)DMSO]，而調製第1混合液。

2)將第1混合液，於室溫(25℃)培養10分鐘。

3)於培養後之第1混合液，加入3倍量(150μl)之各種稀釋液[0.1%(w/v)BSA/0.1M磷酸緩衝液(pH7.6)+0.1%(w/v)去氧膽酸鈉或5%(v/v)乙醇及5%(v/v)DMSO]，而調製第1混合液與稀釋液之第2混合液(200μl)。

4)之後的操作，係藉由與實施例1之4)~12)相同的方法進行。

【0085】3-2)藉由既存方法之測定

作為利用不同方法論之既存方法，係如後述，使用利用放射性物質之DiaSorin-RIA。DiaSorin-RIA係使用市售之套組(25-Hydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA KIT，DiaSorin製)進行。

【0086】具體而言，DiaSorin-RIA係如以下I)及II)而進行。又，作為測定樣品，係與上述3-1)相同，使用人血清14樣品、木炭處理血清強化樣品1樣品之共計15樣品。

I)前處理操作

a)準備玻璃試管。

b)於各試管各注入500μl乙腈。

c)於各試管加入校準器、對照組、或樣品(血清等)各50μl。

d)攪拌樣品溶液10秒鐘。

e)將樣品溶液於室溫以1200×g離心10分鐘。

f)使用上清液作為樣品。

【0087】II)測定操作

a)混合上述樣品 25 μ l、 125 I 25OH維他命 D50 μ l及抗 25OH維他命 D抗體液 1ml。

a)將混合液於室溫培養 90分鐘。

b)於培養後之混合液，加入來自驢的抗山羊抗體 500 μ l。

c)將所得之溶液，於室溫培養 25分鐘。

d)於培養後之混合液，加入 NSB/添加緩衝液 500 μ l。

e)將所得之溶液，於室溫以 1800 $\times$ g 離心 20分鐘。

f)由離心後之溶液完全除去上清液。

g)使用 γ 閃爍計數器進行測定。

【0088】3-3)結果

藉由使用含去氧膽酸鈉之稀釋液的本發明方法所得之測定值，與藉由 DiaSorin RIA法所得之測定值的相關性高(第 1圖， $R^2=0.8993$)。另一方面，使用含有乙醇及 DMSO的稀釋液所得之測定值，與藉由 DiaSorin RIA法所得之測定值的相關性低(第 1圖， $R^2=0.8327$)。因此，認為本發明之方法係有用於維他命 D之測定。

【0089】實施例 4：藉由界面活性劑之處理時間的探討

針對在 25OH維他命 D之高感度測定被視為必要的藉由界面活性劑之處理時間的探討

【0090】方法，係如以下方式進行。

1)於由同一人所採取之同一血清 10 μ l，加入 40 μ l之前處理液[於 Tris-HCl緩衝液(pH7.6)，1%(w/v)去氧膽酸鈉]，藉由攪拌以混合而調製血清與前處理液之第 1混合液

(50 μ l)。第1混合液中之各成分的濃度如下：0.8%(w/v)去氧膽酸鈉。藉由攪拌之混合所需要的時間約為3秒。

2)將第1混合液，於室溫(25 $^{\circ}$ C)培養(10分鐘、5分鐘或1分鐘)。又，將僅藉由攪拌之混合所調製的第1混合液，不進行培養而供之後之操作(培養時間：0分鐘)。

3)於上述2)所得之溶液，加入稀釋液[於PBS(pH7.6)，0.1%(w/v)去氧膽酸鈉及0.1%(w/v)BSA] 150 μ l，而調製第1混合液與稀釋液之第2混合液(200 μ l)。第2混合液中之去氧膽酸鈉之濃度為0.28%(w/v)。

4)之後的操作，係以與實施例1之4)~12)相同的方法進行。

【0091】結果如以下之表3所示。又，於表3，係將藉由含有0.14%(w/v)去氧膽酸鈉的前處理液所得之10分鐘之培養時間的條件下所測定之發光數設為100(對照組)，而將0分鐘、1分鐘及5分鐘之培養時間的條件下所測定之發光數，以相對於對照組的比例表示。

【0092】[表3]

表3.於界面活性劑存在下之培養時間與相對發光數的關係

	10分鐘	5分鐘	1分鐘	僅混合
去氧膽酸Na(0.14%)	100	106	102	101

【0093】其結果，即使是僅混合(培養時間：0分鐘)，亦可獲得與培養10分鐘時幾乎相同程度的相對發光數。其係顯示上述步驟1)之培養操作並不一定為必要，僅藉由混合血清與前處理液，25OH維他命D就由血清中之DBP解離。因此，顯示了藉由本發明之方法，標的物質之測定所需要之時間係可縮短。

【0094】參考例 1：使用既存製品之前處理所需要的時間

於既存製品，血清樣品之前處理所需要之時間，若根據其使用說明書，係如下述。作為既存製品，係使用 DiaSorin-RIA(DiaSorin 公司製)、DiaSorin-Liaison (DiaSorin公司製)。

【0095】[表 4]

表4.既存製品之前處理所需要之時間

	DiaSorin-RIA	DiaSorin-Liaison
處理時間(分鐘)	約10	約10

DiaSorin-RIA：套組之附件的程序說明書

DiaSorin-Liaison：510(K) NumberK071480

【0096】實施例 5：使用具有膽固醇骨架之界面活性劑、及陰離子性、陽離子性或兩性界面活性劑之維他命 D 的測定

以含有具膽固醇骨架之界面活性劑(去氧膽酸鈉)及對維他命 D 之抗體的反應液來處理血清，接著，藉由免疫學方法測定血清中之 25OH 維他命 D。又，亦探討具有膽固醇骨架之界面活性劑及其他界面活性劑的併用效果。

【0097】具體而言，方法係如下述。

1) 於 100ng/ml 強化馬血清 3.75 μ l，加入反應液 [Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6)、0.03%(w/v)或 0.1%(w/v)下述之界面活性劑、0.04%(w/v)去氧膽酸鈉、0.04%(w/v)BSA、抗 25OH 維他命 D 抗體結合粒子液]146.25 μ l，而調製血清與反應液之混合液(150 μ l)。混合液中之各成分的濃度如下：約 0.03%(w/v)或約 0.1%(w/v)下述之界面活性劑；約 0.04%(w/v)去氧膽酸鈉；約 0.04%(w/v)BSA。

2)將混合液，於37℃培養10分鐘。

3)培養後，於磁性盤上收集樣品中之磁粒子，3次洗淨磁粒子。

4)於除去洗淨液之磁粒子，加入懸浮於MES緩衝液之鹼性磷酸酶標識抗體(對25OH維他命D-抗25OH維他命D抗體之免疫複合體的抗體)。

5)將上述4)所得之溶液，於37℃培養10分鐘。

6)培養後，於磁性盤上收集樣品中之磁粒子，3次洗淨磁粒子。

7)於除去洗淨液之磁粒子，加入發光基質(AMPPD)液。

8)將含有磁粒子及發光基質的溶液，於37℃培養5分鐘。

9)以label reader(ARVO; Perkin Elmer)測定發光數。

【0098】結果係如以下之表5所示。又，於表5，將在不添加上述之界面活性劑[0.03%(w/v)或0.1%(w/v)]之條件下所測定之血清的發光數設為100(對照組)，而將在添加具有膽固醇骨架之界面活性劑之條件下所測定之血清的發光數，以相對於對照組的比例表示。

【0099】[表5]

表5.對維他命D的測定之藉由具有膽固醇骨架之界面活性劑所得之樣品處理的效果

	陰離子性					陽離子性	兩性	
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
0.03%	635	91	5931	1327	934	773	102	219
0.10%	12496	286	1721	8548	6215	2021	198	334

反應液係除了0.04%(w/v)去氧膽酸鈉(具有膽固醇骨架之界面活性劑)，亦含有0.03%(w/v)或0.1%(w/v)之以下的界面活性劑：(a)去氧膽酸鈉；(b)膽酸鈉；(c)SDS；(d)N-月桂醯基肌胺酸；(e)正十二烷基肌胺酸；(f)十六烷基二甲基乙基銨溴化物；(g)CHAPS；或(h)zwittergent。

【0100】其結果，確認了在陰離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑及兩性界面活性劑之任一者，與具有膽固醇骨架之界面活性劑(去氧膽酸鈉)的組合中，係有使發光數提升之傾向。又，陰離子性界面活性劑之去氧膽酸鈉、SDS、正月桂基肌胺酸、及十二烷基肌胺酸、以及陽離子性界面活性劑之十六烷基二甲基乙基銨溴化物，係使發光數提升。特別是，去氧膽酸鈉係顯示了發光數之顯著的提升。

【0101】又，於含有具膽固醇骨架之界面活性劑(去氧膽酸鈉)及對維他命D之抗體兩者之反應液所處理的樣品中，成功地進行了維他命D之測定(參照上述步驟1))。其係顯示具有膽固醇骨架之界面活性劑，雖然可由血清中所含之維他命D結合性蛋白質使維他命D解離，但不會阻礙藉由抗體之維他命D的檢測。因此，若藉由本發明，則不須利用所謂分別地以具有膽固醇骨架之界面活性劑、及對維他命D之抗體來處理樣品之繁複的方法，而能夠使用含有具膽固醇骨架之界面活性劑及對維他命D之抗體兩者的反應液，來簡便地測定維他命D。

【0102】實施例6：藉由在類固醇骨架之7位具有及不具羥基之界面活性劑的樣品處理其對於維他命D之測定的影響之探討

於實施例5中，確認了去氧膽酸鈉係較膽酸鈉及CHAPS更顯著地提升訊號強度(表5)。此處，去氧膽酸鈉係於類固醇骨架之7位不具羥基的界面活性劑，而在另一方面，膽酸鈉及CHAPS，係於膽固醇骨架之7位具有羥基

的界面活性劑。藉此而考量到，於膽固醇骨架之7位之羥基的有無，其對於訊號強度造成影響之可能性。因此，係針對於類固醇骨架之7位具有及不具羥基之界面活性劑的樣品處理其對於維他命D之測定的影響進行了探討。

【0103】具體而言，方法係如下述。

1) 於 100ng/ml 強化馬血清 3.75 μ l，加入反應液 [Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6)、0%(w/v)、0.1%(w/v)、0.2%(w/v) 或 0.4%(w/v) 之具有膽固醇骨架之下述界面活性劑、0.04%(w/v) BSA、抗 25OH 維他命 D 抗體結合粒子液] 146.25 μ l，而調製血清與反應液的混合液 (150 μ l)。混合液中之各成分的濃度如下：0%(w/v)、約 0.1%(w/v)、約 0.2%(w/v) 或約 0.4%(w/v) 之具有膽固醇骨架之下述界面活性劑；約 0.04%(w/v) BSA。作為於膽固醇骨架之7位不具羥基的界面活性劑，係使用去氧膽酸鈉及牛去氧膽酸鈉。另一方面，作為於膽固醇骨架之7位具有羥基之界面活性劑，係使用牛膽酸鈉、膽酸鈉、CHAPS。

2) 之後的操作，係以與實施例5之2)~9)相同的方法進行。

【0104】結果係如以下之表6所示。又，於表6，將在不添加上述之界面活性劑 [0.1%(w/v)、0.2%(w/v)、0.4%(w/v)] 的條件下所測定之血清的發光數設為100(對照組)，而將添加於膽固醇骨架之7位具有、或不具羥基之界面活性劑的條件下所測定之血清的發光數，以相對於對照組之比例表示。

【0105】[表 6]

表6.膽固醇骨架7位的羥基之有無對於維他命D之測定的影響

	膽固醇骨架7位之羥基				
	有			無	
濃度	牛膽酸Na	膽酸Na	CHAPS	牛去氧膽酸Na	去氧膽酸Na
0.1%	196	154	120	2411	6759
0.2%	358	461	215	5194	7449
0.4%	3937	4956	1680	5483	5422

【0106】其結果，於膽固醇骨架之7位不具羥基的去氧膽酸鈉及牛去氧膽酸鈉所處理之樣品所測定之訊號強度，與於膽固醇骨架之7位具有羥基的膽酸鈉、牛膽酸鈉所處理之樣品所測定者相比，係顯著地提升。因此，顯示了具有膽固醇骨架之界面活性劑係較本實施例及實施例1，對於維他命D之測定為有效，且於膽固醇骨架之7位不具羥基的界面活性劑，對於維他命D之測定特別有用。

【0107】實施例7：使用含有具膽固醇骨架之界面活性劑、SDS及抗體的反應液之維他命D的測定

對維他命D之測定，使用含有具膽固醇骨架之界面活性劑及SDS的反應液，來測定人血清樣品中之25OH維他命D。

【0108】具體而言，方法係如下述。

1)於不同由來之人血清(#1~16)或木炭處理人血清(對照組)3.75 μ l，加入反應液[Tris-HCl緩衝液(pH7.6)、0.14%(w/v)去氧膽酸鈉、0.015%(w/v)SDS、0.04%(w/v)BSA、及抗25OH維他命D抗體結合粒子液]146.25 μ l，而調製血清與反應液的混合液。

2)之後的操作，係以與實施例5之2)~9)相同的方法進行。又，將所得之測定值與藉由Diasorin-RIA法所得之

測定值進行比較。Diasorin-RIA法係藉由實施例3-2)記載之方法進行。

【0109】結果係如表7及第3圖所示。又，於表7，係將木炭處理人血清之發光數設為100(對照組)，而將所測定之血清的發光數，以相對於對照組之比例表示。

【0110】[表7]

表7.使用膽固醇骨架之界面活性劑及SDS的維他命D測定之發光數值

人血清樣品	0.14%去氧膽酸Na+0.015% SDS
#1	145
#2	1558
#3	1388
#4	753
#5	1169
#6	1541
#7	475
#8	3586
#9	1764
#10	610
#11	4909
#12	371
#13	758
#14	5974
#15	18455
#16	31063
木炭處理血清	100

【0111】其結果，藉由使用含有具膽固醇骨架之界面活性劑、SDS及抗體的反應液之本發明方法所得之測定值，與藉由Diasorin RIA法所得之測定值的相關性高(第3圖， $R^2=0.9881$)。因此，認為本發明係有用於維他命D之測定。

【0112】實施例8：藉由以具有膽固醇骨架之界面活性劑之處理的維他命D結合蛋白質及人血清所釋放出之25OH維他命D的測定

8-1)藉由具有膽固醇骨架之界面活性劑的劃分之處理

將以對照組緩衝液(Tris-HCl)處理之血清藉由凝膠過濾層析法而洗提所得之劃分(對照組劃分)，用於藉由抗25OH維他命D抗體之測定。又，將對照組劃分以去氧膽酸鈉處理，而用於藉由抗25OH維他命D抗體之測定。

【0113】具體而言，方法係如下述。

1)於人血清(50 μ l)加入4倍量(200 μ l)之0.1M HCl緩衝液(pH7.8)，而調製混合液。又，混合液係僅以藉由攪拌之混合(約3秒)而調製(亦即，無培養)。

2)使用凝膠過濾層析儀(GE Healthcare: AKTA explorer)及凝膠過濾層析管柱(superdex200 10/30)，而將藉由0.1M Tris-HCl之混合液洗提(0.25-1管柱容量)，以獲得依存於分子量之劃分。

3)將上述2)所得之劃分、與含有0.4%(w/v)去氧膽酸Na鹽之抗25OH維他命D抗體磁粒子液等量混合(去氧膽酸Na存在下之條件)。另一方面，關於去氧膽酸Na之非存在下之條件，係與不含0.4%(w/v)去氧膽酸Na鹽之抗25OH維他命D抗體結合磁粒子液等量混合。

4)之後的操作，係以與實施例1之2)~12)相同的方法進行。

【0114】其結果，不以去氧膽酸處理的情形，係無法檢測出有意義的發光數，而無法測定25OH維他命D(第4圖)。另一方面，以去氧膽酸處理而測定25OH維他命D的情形，於劃分#15-#17中係檢測出強發光數。

【0115】8-2)藉由西方墨點法之對照組劃分中的維他命D結合蛋白質之檢測

針對維他命D之檢測劃分與維他命D結合蛋白質之檢測劃分是否一致進行探討。

【0116】具體而言，方法係如下述。

1)於對照組劃分(上述8-1所得之劃分)30 μ l，加入其1/3倍量(10 μ l)之NuPAGE LSD樣品緩衝液(invitrogen)、終濃度1mM之DTT，而調製混合液。

2)將混合液於100℃之超純水沸騰5分鐘。

3)將所得之溶液供應至4-10丙烯醯胺凝膠。

4)施加200V之電壓25分鐘，實施SDS-PAGE。

5)將所得之凝膠，利用iBlot(invitrogen)轉印至PVDF膜。

6)將轉印膜置入5%脫脂乳溶液中，於室溫下振盪1小時。

7)將溶液更換為PBSt，振盪轉印膜5分鐘，進行洗淨。

8)再重複進行上述洗淨操作二次。之後，將溶液更換為5%脫脂乳溶液。

9)將作為初級抗體之抗人維他命D結合蛋白質抗體(Abcam)加入5%脫脂乳溶液而成為如1 μ g/ml，並將轉印膜於4℃振盪一晚。

10)將溶液更換為PBSt，振盪轉印膜5分鐘，進行洗淨。

11)再重複進行上述洗淨操作二次。之後，將溶液更換為5%脫脂乳溶液。

12)將作為二級抗體之抗老鼠Ig抗體-HRP加入5%脫脂乳溶液而稀釋成1000倍，並將轉印膜於4℃振盪一晚。

13)將溶液更換為PBSt，振盪轉印膜5分鐘，進行洗淨。

14)再重複進行上述洗淨操作二次。之後，將溶液更換為PBSt超純水。

15)將轉印膜於超純水清洗1次。

16)將溶液更換為發光基質(ECL select；GE Healthcare)。

17)於LAS3000 MINWIN(FUJIFILM)實施轉印膜之攝影。

【0117】其結果，檢測出維他命D結合蛋白質之劃分#15-17，係與實施例8-1中檢測出25OH維他命D之劃分一致(第5圖)。因此，表示以0.1M Tris-HCl處理及洗提之情形，25OH維他命D係以與維他命D蛋白質結合的狀態被回收。

【0118】8-3)藉由具有膽固醇骨架之界面活性劑的由維他命D結合蛋白質之維他命的解離

針對藉由以去氧膽酸之處理，人血清中之25OH維他命D是否游離來進行探討。

【0119】具體而言，方法係如下述。

1)於人血清或143ng/ml 25OH維他命D添加1%BSA-PBS溶液(50μl)，加入4倍量(200μl)之0.4%(w/v)去氧膽酸溶液，而調製混合液。又，混合液係僅以藉由攪拌之混合(約3秒鐘)來調製(亦即，無培養)。

2) 使用凝膠過濾層析儀 (GE Healthcare : AKTA explorer) 及凝膠過濾層析管柱 (superdex200 10/30), 藉由 0.4 去氧膽酸溶液沖提, 以獲得依存於分子量之劃分。接著, 回收管柱容量之 0.25 ~ 1。

3) 將進行了上述處理之樣品與不含去氧膽酸之抗 25OH 維他命 D 抗體結合磁粒子液等量地混合。

4) 之後的操作, 係以與實施例 1 之 5) ~ 12) 相同的方法進行。

【0120】其結果, 係由分子量較實施例 8-1) 之檢測出維他命 D 結合蛋白質之劃分 #15-17 小的劃分 #22-28 檢測出 25OH 維他命 D (第 6 圖)。由於以去氧膽酸沖提之際檢測出 25OH 維他命 D 之劃分 #22-28, 係與沖提出游離之 25OH 維他命 D 的劃分 #22-28 相同 (第 6 圖), 係表示藉由以去氧膽酸的處理, 會可使人血清中之 25OH 維他命 D 游離。

【0121】8-4) 藉由以具有膽固醇骨架之界面活性劑的處理, 而由維他命 D 結合蛋白質及血清釋放出 25OH 維他命 D。

探討藉由以具有膽固醇骨架之界面活性劑的處理, 是否會由維他命 D 結合蛋白質及 25OH 維他命 D₃ 之複合體釋放出 25OH 維他命 D。

【0122】具體而言, 方法係如下述。

1) 如表 8 所示而調製樣品。具體而言, 係於精製維他命 D 結合蛋白質 (Abcam) 1.64mg/ml (+ 或 -) 17.2 μ l, 加入 25OH 維他命 D₃ (Tronto chemical reagent) 1mg/ml (+ 或 -) 2.82 μ l, 而調製樣品, 接著將所得之樣品培養 10 分鐘。

2)於上述樣品 3.75 μ l，加入表 8 所示之溶液 (pH7.6 Tris-HCl緩衝液、0.138%(w/v)去氧膽酸鈉鹽+0.038%BSA +25OH維他命D抗體結合粒子液)146.25 μ l，而調製混合液。

3)之後的操作，係以與實施例 1 之 5)～12)相同的方法進行。

【0123】[表 8]

表8.詳細之實驗條件

編號	樣品		去氧膽酸處理
	25OH維他命D3	維他命D結合蛋白質	
1	+	-	+
2	+	+	-
3	+	+	+
4	-	-	-

【0124】其結果，使用市售之精製維他命D結合蛋白質及25OH維他命D3而形成維他命D結合蛋白質及25OH維他命D3之複合體的情形，係無法檢測出25OH維他命D3(參照第7圖及表8之編號2)。另一方面，以去氧膽酸處理的情形，則可測定25OH維他命D3(參照第7圖及表8之編號3)。該場合之測定數，係為編號1之測定數的88%(第7圖及表8)。

【0125】由以上，實證了藉由以具有膽固醇骨架之界面活性劑的處理，可由維他命D結合蛋白質及25OH維他命D3釋放出25OH維他命D，以及，可高感度地測定所釋放出之25OH維他命D。

[產業上之可利用性]

【0126】本發明之方法及套組係有用於測定維他命D。

【符號說明】

無。

申請專利範圍

公告本

1. 一種維他命 D 之測定方法，其包含以下：

1) 以具有於 7 位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽來處理樣品；及

2) 檢測處理後之樣品中之維他命 D。

2. 如請求項 1 之方法，其中，上述具有於 7 位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽，係去氧膽酸或是牛去氧膽酸 (taurodeoxycholic acid)、或該等之鹽。

3. 如請求項 1 之方法，其進一步包含：以與上述具有於 7 位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽不同的其他變性劑來處理樣品，

而樣品之處理係以其他變性劑，接著是上述具有於 7 位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽的順序來進行；或是

樣品之處理係藉由上述具有於 7 位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽，以及其他變性劑而同時進行。

4. 如請求項 3 之方法，其中，其他變性劑係含有由烴鏈所構成之疏水性部分、及親水性部分的界面活性劑。

5. 如請求項 1 之方法，其中，樣品之處理係僅以混合來進行。

6.如請求項1之方法，其係包含以下之方法：

1')以含有上述具有於7位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽，以及對維他命D之抗體的反應液來處理樣品；並

2')檢測處理後之樣品中之維他命D。

7.如請求項1之方法，其係包含以下之方法：

1'')以含有變性劑之前處理劑來處理樣品；

2'')將經1'')處理過之樣品，以含有上述具有於7位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽的稀釋液來處理；以及

3'')檢測經2'')處理過之樣品中之維他命D。

8.如請求項1之方法，其中，樣品係來自人的樣品。

9.如請求項1之方法，其中，樣品係血液相關樣品。

10.一種維他命D之測定用套組，其包含以下：

1)具有於7位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽；以及

2)對維他命D之抗體及/或維他命D標準品。

11.如請求項10之測定用套組，其係包含含有上述具有於7位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之鹽，以及對維他命D之抗體的反應液。

12.如請求項10之測定用套組，其包含以下：

1')含有變性劑之前處理劑；

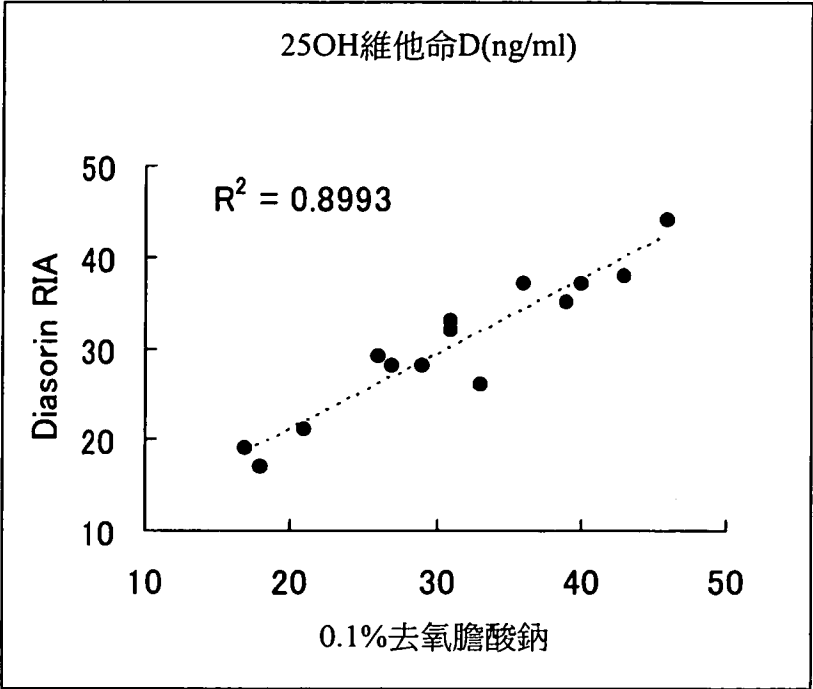
2')含有上述具有於7位不具羥基的類固醇骨架之膽汁酸或是具有界面活性作用之其衍生物、或該等之

鹽的稀釋液；以及

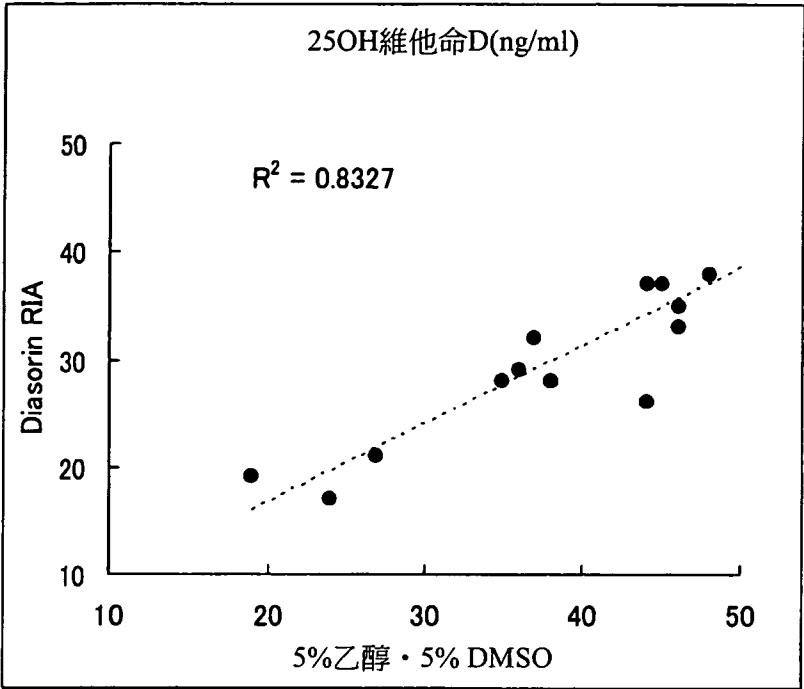
3')對維他命 D 之抗體及 / 或維他命 D 標準品。

圖式

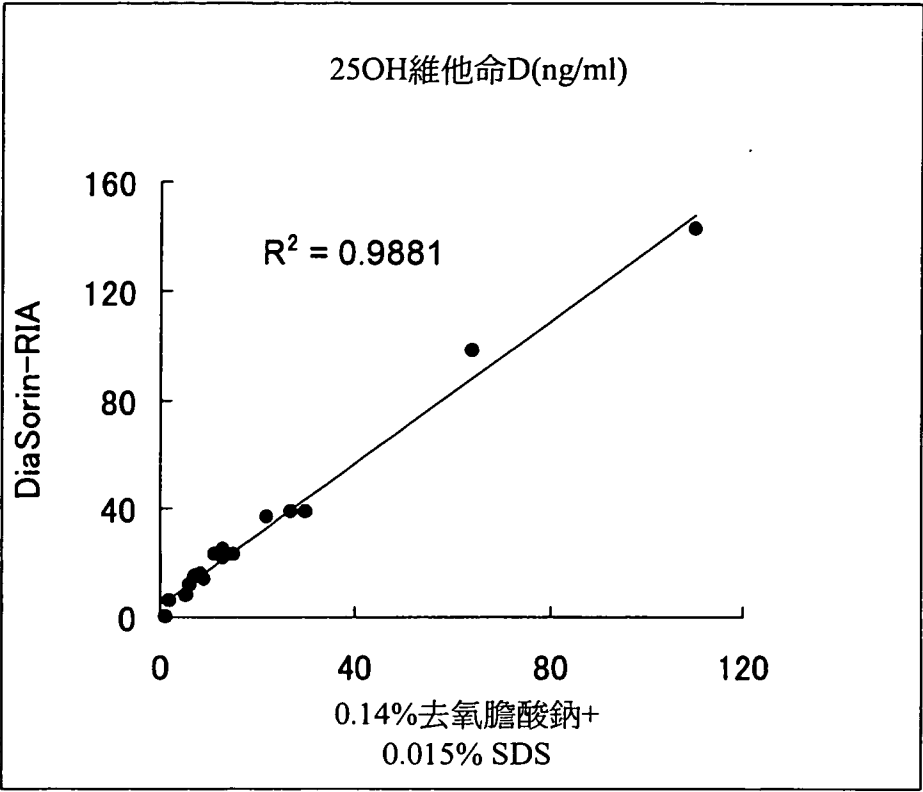
公告本



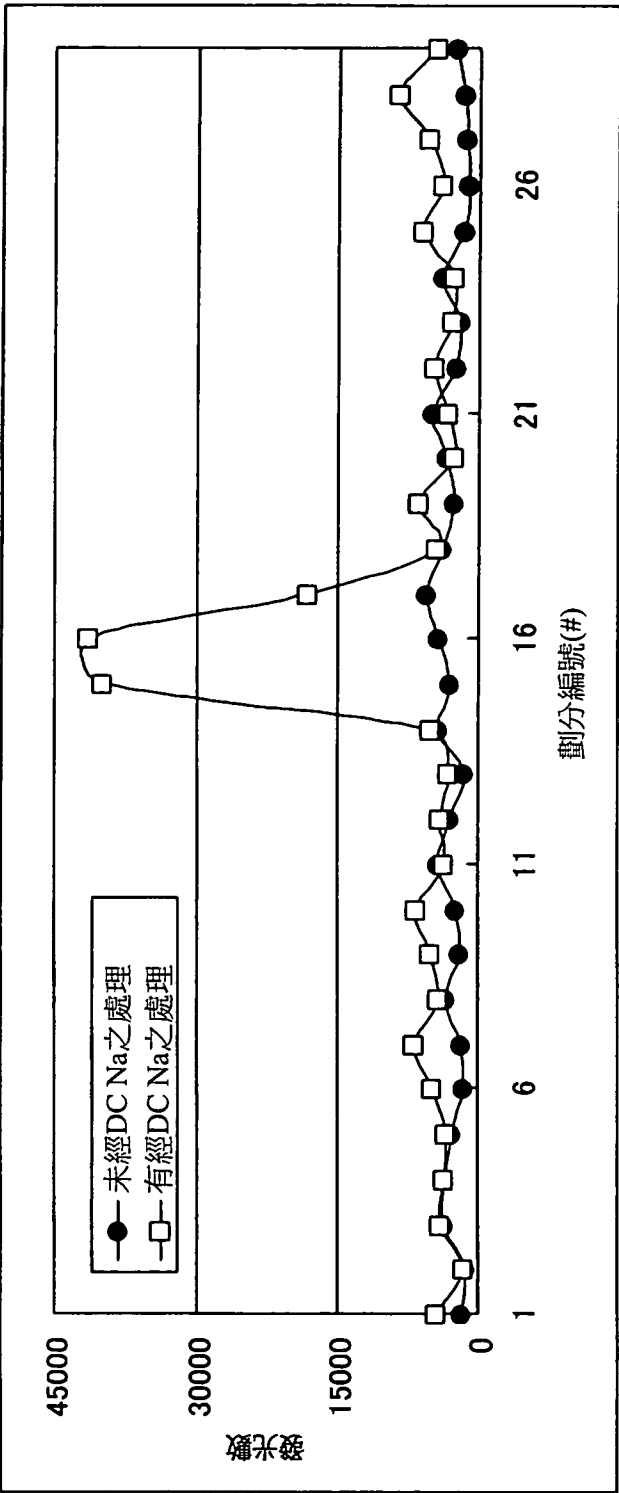
第1圖



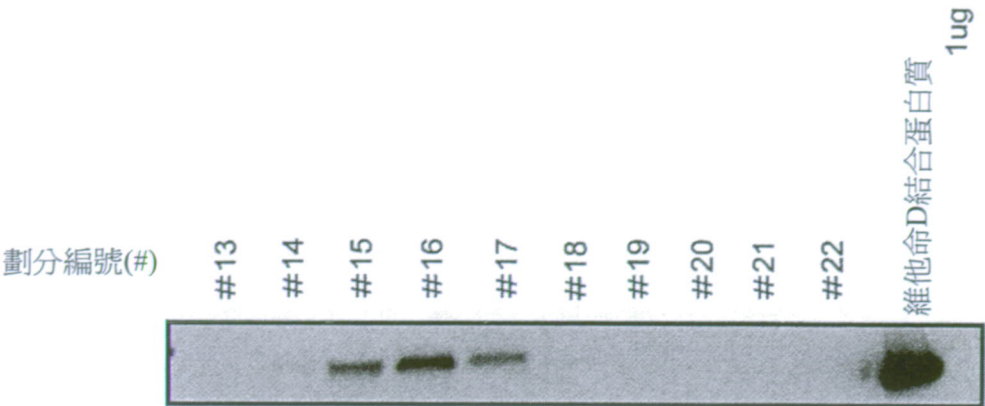
第2圖



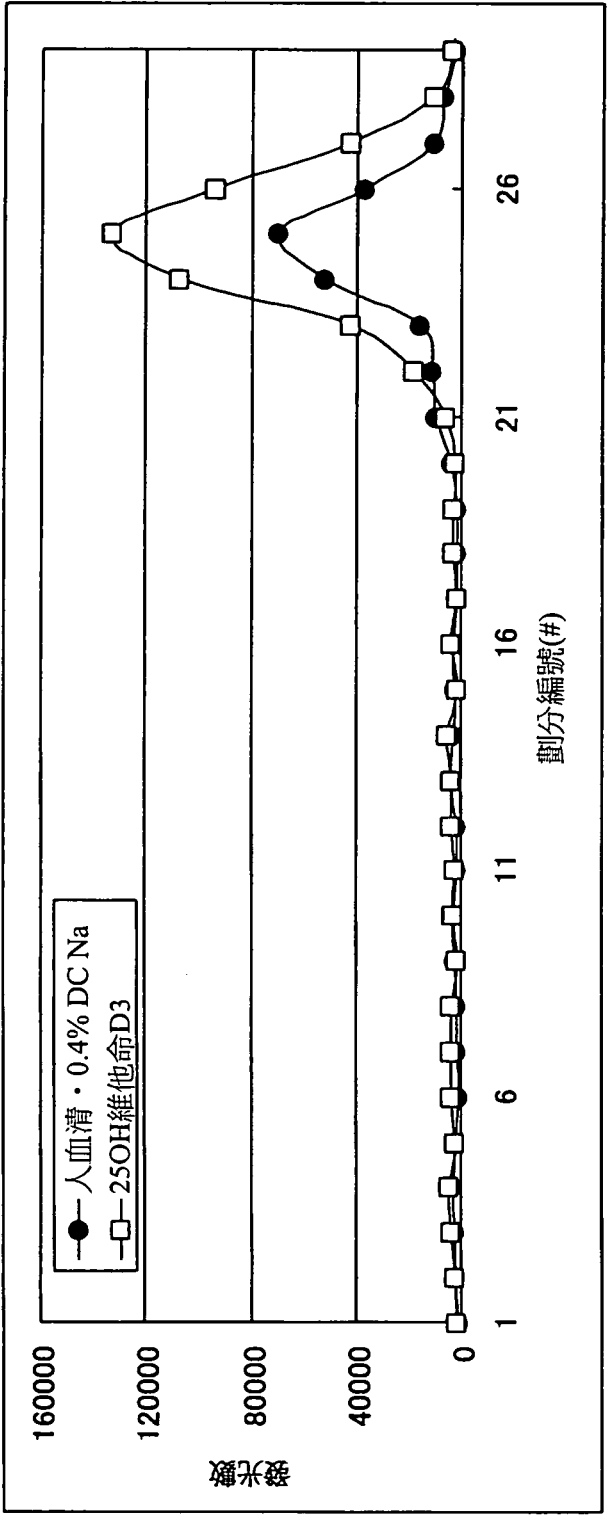
第3圖



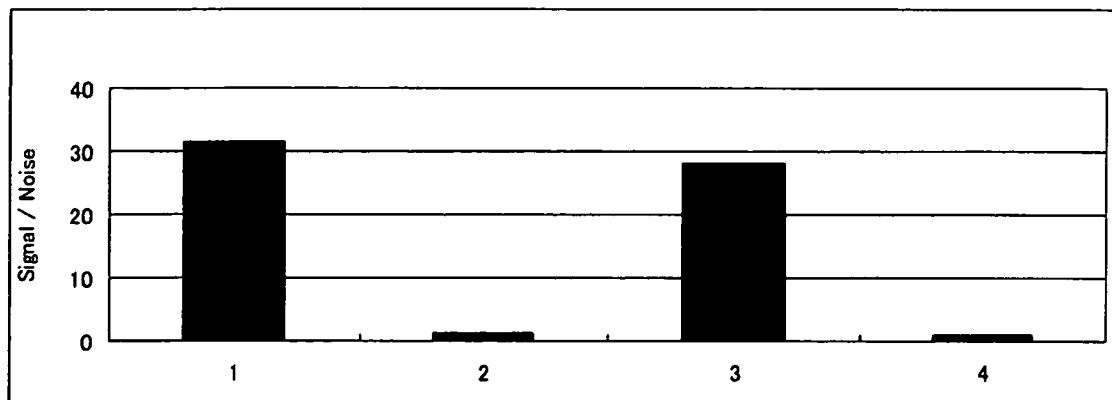
第4圖



第5圖



第6圖



第7圖