



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1748036 B

(45) 授权公告日 2012. 01. 11

(21) 申请号 200380109741. 3 *G01N 33/92* (2006. 01)

(22) 申请日 2003. 12. 12 (56) 对比文件

(30) 优先权数据 US 6194164 B1, 2001. 02. 27, 权利要求, 实施  
362970/2002 2002. 12. 13 JP 例.

(85) PCT申请进入国家阶段日 审查员 田园  
2005. 08. 15

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/JP2003/015995 2003. 12. 12

(87) PCT申请的公布数据  
W02004/055204 JA 2004. 07. 01

(73) 专利权人 电化生研株式会社  
地址 日本东京都

(72) 发明人 松井宽史

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001  
代理人 郭文洁 王景朝

(51) Int. Cl.  
*C12Q 1/60* (2006. 01)  
*C12Q 1/44* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

低密度脂蛋白中胆固醇的多重定量方法

(57) 摘要

本发明旨在提供同时定量作为血液中待检测成分的低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇的方法。一种同时定量作为生物样品中待检测成分的低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇的方法, 由此通过单个测量步骤来定量生物样品所含低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇。

1. 一种同时测定生物样品所含低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇的方法,其中用一次测量定量生物样品所含低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇,且该方法包括使生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白中的胆固醇反应的第一步和使剩余的低密度脂蛋白中的胆固醇反应的第二步,其中,用于第一步的第一试剂包含 4-氨基安替比林和基于酚或苯胺的氢供体;

在存在对除低密度脂蛋白外的脂蛋白起作用的表面活性剂的情况下,第一步包括使胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶作用于生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白,将所产生的过氧化氢转化成醌染料,然后测量反应产物,由此由第一步反应可获得反映生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白中的胆固醇的测量值,其中,所述的对除低密度脂蛋白外的脂蛋白起作用的表面活性剂为聚氧乙烯苄基苯基醚;

第二步包括,向第一步的反应产物添加至少作用于低密度脂蛋白的表面活性剂,使胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶作用于剩余的低密度脂蛋白,将所产生的过氧化氢转化成醌染料,然后测量反应产物;由此由第二步反应可获得反映剩余的低密度脂蛋白中的胆固醇的存在量的测量值,其中,所述的至少作用于低密度脂蛋白的表面活性剂选自:聚氧化乙烯十二烷基醚、聚氧化乙烯十六烷基醚、聚氧乙烯油基醚、聚氧乙烯高级醇醚、聚氧乙烯辛基苯基醚、聚氧化乙烯壬基苯基醚;

通过得到在第一步和第二步中所获得的作为测量值的吸光度的差异,定量血液中低密度脂蛋白中的胆固醇;通过得到基于在第一步中所获得的作为测量值的吸光度变化和在第二步中所获得的作为测量值的吸光度变化的总吸光度定量总胆固醇;根据上述分别在第一反应和第二反应中所获得的两个值同时分别测定生物样品中低密度脂蛋白中胆固醇的存在量和总胆固醇的存在量,

其中所述的方法是使用用于临床和化学检测的自动分析仪,仅用一次测量在不同测量条件下进行的。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中第一步是在白蛋白存在下进行的。

3. 权利要求 1 或 2 中任一项所述的方法,其中,在第一步骤中进一步添加脂蛋白脂酶。

## 低密度脂蛋白中胆固醇的多重定量方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及同时测量血液中作为被检成分的低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇的方法。

### 背景技术

[0002] 低密度脂蛋白（以下称作“LDL”）在血液胆固醇运输中起主要作用。特别是，在动脉粥样硬化病例中血管壁上沉积的绝大多数胆固醇来自 LDL。LDL 胆固醇量的增加是动脉粥样硬化疾病的主要危险因素之一。因此 LDL 胆固醇的单独定量在临床上很有用。此外，总胆固醇测量包括测量所有脂蛋白，如乳糜微粒（CM）、极低密度脂蛋白（VLDL）、LDL、以及高密度脂蛋白（HDL）中的胆固醇。总胆固醇测量仍然是主要的脂类检验。

[0003] 定量 LDL 胆固醇的常规方法包括一种包含两个操作（分级分离和胆固醇定量）的方法以及使用基于总胆固醇、HDL 胆固醇和甘油三酯水平的 Friedewald' s 方程的计算方法。

[0004] 分级分离包括超速离心法、沉淀法、和免疫学方法等。这些方法需要离心或过滤样品，考虑到便利和经济的原因，使得它们当前很难在临床检查领域中推广。此外，包括 Friedewald' s 方程的计算方法因其不考虑个体变异，所以在准确度方面也有很多问题，其使用受限。

[0005] 然而最近已经报道了不需要分级分离的定量 LDL 胆固醇的方法（JP 专利公开（Kokai）No. 11-318496A（1999））。这种方法当前在检测领域中应用于临床检测的试剂。这种方法包括第一步，选择性除去样品中除 LDL 外的脂蛋白中的胆固醇的（术语“除去”意思是分解酯型胆固醇和游离胆固醇，并且使分解产物在随后的第二步中不被检测到），以及第二步定量 LDL 胆固醇。

[0006] 然而，尽管上述测量 LDL 胆固醇的试剂在临床上很有用，但是该试剂的使用没有轻易地普及。这是因为实践中一直广泛地进行总胆固醇测量，并且通过 Friedewald' s 方程获得 LDL 胆固醇水平。然而，如上所述，通过使用 Friedewald' s 方程获得的 LDL 胆固醇水平有很多问题。因此，LDL 胆固醇水平的精确测量具有临床意义。因此，期望进一步改进和推广使用测量 LDL 胆固醇的试剂，其具有很高的临床意义。

[0007] 同时，关于 HDL 中胆固醇的测量，已经报道了仅用一次测量连续测量 HDL 中胆固醇和总胆固醇的方法（M L Sampson 等，Ann ClinBiochem, 37, 479-487, 2000）。这种方法包括将样品放入试管中，使用抗 apoB 抗体测量样品中的 HDL 胆固醇，使用脱氧胆酸破坏抗 apoB 抗体和 apoB 抗体的复合体（含有结合到其上的抗 apoB 抗体的 HDL 胆固醇），然后酶促测量剩余的非 HDL 胆固醇。可通过将两次测量获得的值加起来得到总胆固醇水平。广泛地在医学检查等领域中常规测量总胆固醇和 HDL 胆固醇。因此，能同时测量两种胆固醇的水平很有意义。专利文件 1

[0008] JP 专利公开（Kokai）No. 11-318496A（1999）

[0009] 非专利文件 1

[0010] M L Sampson 等, Ann Clin Biochem, 37, 479-487, 2000

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的目的是提供仅用一次测量就能同时定量 LDL 胆固醇和总胆固醇的方法。这个方法作为一种多重定量方法很有效,其中仅用一次测量可获得多项的定量值。

[0013] 鉴于最近引起注意的 LDL 胆固醇的精确测量的重要性,以及通常已知的总胆固醇测量的重要性,我们集中研究了建立同时测量 LDL 胆固醇和总胆固醇的系统。

[0014] 通过改变部分上述定量 LDL 胆固醇的方法,并且进一步使用已经用于临床和化学检查的自动分析仪的同时分析多个项目的功能我们已经能够仅用一次测量同时对 LDL 胆固醇和总胆固醇定量;即,可仅用一次测量分析在不同条件下的测量值的功能。

[0015] 具体地,这种定量方法能在第一步中检测样品中除 LDL 外的脂蛋白中的胆固醇(其在常规方法的第一步中被选择性地除去)在第二步中检测 LDL 胆固醇反应。

[0016] 图 1 显示本发明方法的原理。如图 1 所示,本发明的方法包括两个步骤。在第一步中,基于样品中除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇发生反应,然后测量因反应所导致的反应液的吸光度变化。在第二步中,基于样品中 LDL 中的胆固醇发生反应,然后测量因反应所导致的反应液的吸光度变化。在第二步中吸光度的变化相应于 LDL 胆固醇的量,而第一步中的吸光度变化与第二步中的吸光度变化之和相应于总胆固醇量的变化。使用自动分析仪,通过改变测量这种吸光度变化的分析条件,可仅用一次测量同时测量多个项目。图 1 显示该测量方法原理的实例。具体地,在第一步中,可仅基于 LDL 中的胆固醇发生反应。在第二步中,可基于除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇的发生反应。

[0017] 如在图 1 中所示,在使用自动分析仪同时分析多个项目的测量条件下,通过第一步中的反应所获得的吸光度与第二步中的反应所获得的吸光度的差异来定量 LDL 胆固醇。具体地,通过从测量 2 中所获得的吸光度(即,在第二步中测得的吸光度)减去测量 1 中所获得的吸光度(即,在第一步中测得的吸光度)得到这种差异。

[0018] 在另一种测量条件下,通过得到吸光度的总量(通过测量 2 获得的吸光度)定量总胆固醇;即,第一步中的吸光度变化和第二步中的吸光度变化之和。

[0019] 如上所述,本发明提供利用自动分析仪同时分析多个项目的功能,仅用一次测量同时定量生物样品中待测成分中的 LDL 胆固醇和总胆固醇的方法。

[0020] 本发明如下:

[0021] (1) 一种同时测定生物样品所含低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇的方法,其中仅用一次测量定量生物样品所含低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇。

[0022] (2) (1) 的方法,其包括引起生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白中的发生胆固醇反应的第一步和引起剩余的低密度脂蛋白中的胆固醇发生反应的第二步。

[0023] (3) (1) 的方法,其中仅用一次测量获得反映生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白中胆固醇现有量的测量值以及反映低密度脂蛋白中的胆固醇现有量的测量值,接着根据上述两个值同时测定生物样品所含低密度脂蛋白中的胆固醇现有量和总胆固醇的现有量。

[0024] (4) (3) 的方法,其包括获得反映生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白中胆固醇现有量的测量值的第一步和获得反映剩余的低密度脂蛋白中的胆固醇现有量的测量值的第二步。

[0025] (5) (1) 到 (4) 中任何一项的方法,其中,在存在对除低密度脂蛋白外的脂蛋白起

作用的表面活性剂时,第一步包括使胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶作用于生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白,将所产生的过氧化氢转化成醌染料,然后测量反应产物,或者包括使胆固醇酯酶和胆固醇脱氢酶作用于生物样品中除低密度脂蛋白外的脂蛋白,然后测量所产生的 NADH(还原的  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)。

[0026] (6) (1) 到 (5) 中任何一项的方法,其中第二步包括,向第一步的反应产物添加至少作用于低密度脂蛋白的表面活性剂,使胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶作用于剩余的低密度脂蛋白,将所产生的过氧化氢转化成醌染料,然后测量反应产物,或者包括使胆固醇酯酶和胆固醇脱氢酶作用于剩余的低密度脂蛋白,接着测量所产生的 NADH(还原的  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)。

[0027] (7) (1) 到 (6) 中任何一项的方法,其中使用用于临床和化学检测的自动分析仪,仅用一次测量在不同测量条件下进行分析。

[0028] (8) (1) 到 (7) 中任何一项的方法,其中通过找到在第一步和第二步中所获得的作为测量值的吸光度的差异来定量血液中低密度脂蛋白中的胆固醇。

[0029] (9) (1) 到 (8) 中任何一项的方法,其中通过得到基于在第一步中所获得的作为测量值的吸光度变化和在第二步中所获得的作为测量值的吸光度变化的总吸光度来定量总胆固醇。

[0030] (10) 一种用于根据 (1) 到 (6) 中任何一项的方法同时测定生物样品所含低密度脂蛋白中的胆固醇和总胆固醇的试剂组合物。

[0031] (11) (10) 的试剂组合物,其包括作用于除低密度脂蛋白外的脂蛋白的表面活性剂、至少作用于低密度脂蛋白的表面活性剂,胆固醇酯酶、和胆固醇氧化酶。

[0032] (12) (10) 的试剂组合物,其包括作用于除低密度脂蛋白外的脂蛋白的表面活性剂、至少作用于低密度脂蛋白的表面活性剂、胆固醇酯酶、和胆固醇脱氢酶。

[0033] 本发明是同时测定生物样品中所含 LDL 中的的胆固醇和总胆固醇的方法,其中仅用一次测量定量生物样品中所含 LDL 中的的胆固醇和总胆固醇。具体地,本发明的方法包括使生物样品中除 LDL 外的脂蛋白中的胆固醇起反应的第一步以及随后使剩余的 LDL 中的胆固醇起反应的第二步。例如,本发明的方法可通过仅用一次测量获得反映生物样品中除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇现有量的测量值和反映 LDL 中胆固醇现有量的测量值,然后根据上述两个值同时测定生物样品中所含 LDL 中的的胆固醇和总胆固醇的现有量来完成。

[0034] 脂蛋白中所含有的胆固醇的实例包括酯型胆固醇(胆固醇酯)和游离胆固醇。在本说明书中,“胆固醇”包含这两种类型。

[0035] 本发明的方法所检验的生物样品是可能含有脂蛋白,如 HDL、LDL、VLDL、或 CM 的样品。这种生物样品的实例包括但不限于,体液,如血液、血清、和血浆,及其稀释液。“除 LDL 外的脂蛋白”是指 HDL、VLDL、CM 等。

[0036] “反映除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇现有量的测量值”和“反映 LDL 中胆固醇现有量的测量值”是指通过定量生物样品所含脂蛋白中胆固醇的浓度或绝对量所获得的值。获得这种值的测量方法没有限制。这种值对应于生物样品所含脂蛋白中胆固醇的浓度或绝对量,最终通过多种方法的组合而获得这个值。例如,这个值可能与生物样品所含脂蛋白中胆固醇的浓度或绝对量成正比或者成反比。这种测量值的实例是来自用特殊药物处理脂蛋白中的胆固醇所产生的化合物的吸光度。另外,在这种情况下,这种测量值的实例包括绝对值

和变化值。例如,在第一步和第二步之间的吸光度变化如图 1 所示,除了在第一步中所提高的吸光度,还包括在第二步中所提高的吸光度。这是因为在第一步的反应中所产生的化合物与在第二步的反应中所产生的化合物具有相同的吸光度波长。在第一步的反应中所产生的化合物的吸光度波长可以不同于在第二步的反应中所产生的化合物的吸光度波长。在这种情况下,不将在第二步中所提高的吸光度加到在第一步中所提高的吸光度中,当开始第二步时在另一个波长测量的吸光度从 0 开始提高。在图 1 中,通过测量 1 获得在第一步中反映除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇现有量的吸光度。这种吸光度是“反映除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇现有量的测量值”。此外,在第二步中,吸光度通过测量 2 获得,除了反映在第一步中所获得的除 LDL 外脂蛋白中胆固醇的现有量的吸光度,其还包括对应于 LDL 中胆固醇现有量的吸光度。这种吸光度代表总胆固醇的现有量。此外,这种吸光度是“反映 LDL 中胆固醇现有量的测量值”,因为除了在第一步中所获得的吸光度外,其还包括对应于 LDL 中胆固醇现有量的吸光度。此外,当考虑添加这种吸光度时,“反映 LDL 中胆固醇现有量的测量值”也可被说成是“含有反映 LDL 中胆固醇现有量值的测量值”。此外,在这种情况下,对应于已经加上吸光度的 LDL 中胆固醇现有量的吸光度变化,也是“反映 LDL 中胆固醇现有量的测量值”。即,在第二步中,可仅测量吸光度变化。

[0037] 在此期间,当在第一步中所产生的化合物的吸光度波长与在第二步中所产生的化合物的吸光度的波长不同时,在第一步中所测得的吸光度是“反映在除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇现有量的测量值”。在第二步中,在不同于第一步中的波长下所测得的吸光度是“反映在 LDL 中的胆固醇现有量的测量值”。

[0038] 当用一次测量获得两类测量值时,所使用的“仅一次测量”包括从处理生物样品到测量以获得许多必需测量值的一系列处理。这种一次测量包括添加试剂和获得测量值的许多实例。优选地,一次测量是在一个测量管或单独的孔中完成。

[0039] “基于这两个测量值同时获得生物样品中所含 LDL 中的的胆固醇和总胆固醇的现有量”意思是通过计算这两个测量值获得 LDL 中的胆固醇和总胆固醇的浓度或绝对量。例如,如图 1 所示,基于在测量 2 中所获得的测量值可得到总胆固醇的现有量。可通过从在测量 2 中所获得的测量值中减去在测量 1 中所获得的测量值得到 LDL 中胆固醇的现有量。如上所述当在第一步的反应中所产生的化合物的吸光度波长不同于在第二步的反应中所产生的化合物的吸光度波长时,可从在第二步中所测得的值得到 LDL 中胆固醇的现有量,可通过将在第一步中所测得的值加上在第二步中所测得的值得到总胆固醇的现有量。

[0040] 本发明的方法包括第一和第二步。第一步包括处理样品中除 LDL 外的脂蛋白,如 HDL、VLDL、和 CM 中的胆固醇,然后得到反映现有量的测量值。随后的第二步包括处理剩余的 LDL 胆固醇,然后得到反映现有量的测量值。因此,“处理”意思是用化学、物理、和 / 或生物化学方法进行反应。

[0041] 第一步中的处理意思是在存在对除 LDL 外的脂蛋白起作用的表面活性剂时,通过酶反应分解胆固醇。可用化学、物理、和 / 或生物化学方法测量分解产物或由反应所产生的产物。“表面活性剂作用于”指分解脂蛋白和从脂蛋白中释放胆固醇。

[0042] 选择性测量除 LDL 外的脂蛋白中所含有的胆固醇(即,在 HDL、VLDL、CM 等中所含有的胆固醇)的具体实例包括下列方法。

[0043] 具体地,方法的实例包括,在存在对除 LDL 外的脂蛋白起作用的表面活性剂时,使

胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶对它们的靶脂蛋白起作用,通过 4-氨基安替比林与基于酚或苯胺的氢供体化合物之间的氧化缩合反应,经过使用过氧化物酶,将所产生的过氧化氢转化成有色的醌,然后在 400nm 和 700nm 波长之间测量反应产物。在这个实例中所测得的有色醌的吸光度反映生物样品中除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇的现有量。另外,在氢供体化合物中,这种基于苯胺的氢供体化合物的实例包括 N-(2-羟基-3-磺基丙基)-3,5-二甲氧基苯胺 (HDAOS)、N-乙基-N-磺基丙基-3-甲氧基苯胺 (ADPS)、N-乙基-N-磺基丙基苯胺 (ALPS)、N-乙基-N-磺基丙基-3,5-二甲氧基苯胺 (DAPS)、N-磺基丙基-3,5-二甲氧基苯胺 (HDAPS)、N-乙基-N-磺基丙基-3,5-二甲氧基苯胺 (MAPS)、N-乙基-N-磺基丙基-3-甲基苯胺 (TOPS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-3-甲氧基苯胺 (ADOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)苯胺 (ALOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-3,5-二甲氧基苯胺 (DAOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-3,5-二甲基苯胺 (MAOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-3-甲基苯胺 (TOOS)、和 N-磺基丙基苯胺 (HALPS)。

[0044] 这种方法的另一个实例包括使胆固醇酯酶和胆固醇脱氢酶作用于它们的靶脂蛋白,并在 340nm 波长处测量所产生的 NADH(还原的  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)。然而,该方法不限于此。在这个实例中测得的 NADH 的吸光度反映在生物样品中除 LDL 外的脂蛋白中胆固醇的现有量。

[0045] 第一步的反应液中胆固醇酯酶的浓度优选大约 0.2 到 2.0IU/ml。关于其来源,由假单胞菌 (*Pseudomonas*) 属细菌所产生的胆固醇酯酶是有效的。此外,胆固醇氧化酶的浓度优选大约 0.1 到 0.7IU/ml。优选使用细菌、酵母等来源的胆固醇氧化酶。此外,当将过氧化氢转化成有色醌时,过氧化物酶的浓度优选 0.4 到 3.0IU/ml。4-氨基安替比林的浓度优选 0.4 到 4.0mmol/l。基于酚或苯胺的氢供体化合物的浓度优选 0.4 到 2.0mmol/l。

[0046] 此外,当测量除醌染料外的 NADH 时,胆固醇酯酶的浓度与上述相同,胆固醇脱氢酶的浓度优选 0.2 到 1.0IU/ml, NADH 的浓度优选 2.0 到 5.0mmol/l。

[0047] 第一步中使用的作用于除 LDL 外的脂蛋白的表面活性剂的优选实例是具有 HLB 值 13 以上、15 以下,优选 13 以上、14 以下的聚环氧烷衍生物。这种衍生物的实例包括具有高级醇的缩合产物、具有高级脂肪酸的缩合产物、具有高级脂肪酸酰胺的缩合产物、具有高级烷基胺的缩合产物、具有高级烷基硫醇的缩合产物、以及具有烷基酚的缩合产物。另外,计算表面活性剂的 HLB 的方法是公知的,描述于,例如, Hiroshi Horiuchi, " New Surfactants, " 1986, Sankyo Shuppan 中。

[0048] 这种 HLB 值 13 以上、15 以下的聚环氧烷衍生物的优选的具体实例包括,但不限于, HLB 值 13 以上、15 以下的化合物,如聚氧化乙烯十二烷基醚、聚氧化乙烯十六烷基醚、聚氧化乙烯油基醚、聚氧化乙烯高级醇醚、聚氧化乙烯辛基苯基醚、聚氧化乙烯壬基苯基醚、以及聚氧化乙烯苄基苯基醚。

[0049] 在第一步中使用的上述表面活性剂的浓度优选可以是大约 0.1 到 10g/l,更优选大约 0.5 到 5.0g/l。

[0050] 第一步优选在 pH5 到 9 的缓冲液中进行。优选的缓冲液是含有胺,如 tris、三乙醇胺的缓冲液,或者 Good's 缓冲液。具体说来优选作为 Good's 缓冲液的 Bis-Tris、PIPES、MOPSO、BES、HEPES、和 POPS0。这种缓冲液的浓度优选大约 10 到 500mM。

[0051] 为了在第一步中抑制与 LDL 的反应以及进一步提高与其它脂蛋白的反应,反应液

可含有二价金属离子。可使用二价金属离子如铜离子、铁离子、以及镁离子。特别优选镁离子。二价金属离子的浓度可优选大约 5 到 200mM。

[0052] 此外,在第一步中也可向反应液中添加脂蛋白脂酶。优选添加这种酶,因为其尤其易于 VLDL 中的胆固醇的反应。在反应液中这种酶的浓度可优选是大约 5.0 到 10.0U/ml。

[0053] 在第一步中反应温度可优选大约 30°C 到 40°C,最优选 37°C。另外,反应时间可以是大约 2 到 10 分钟。

[0054] 根据本发明的方法,在存在白蛋白时进行第一步。白蛋白没有特殊限制,只要是白蛋白即可。可优选使用商品化的白蛋白,如血清白蛋白。白蛋白的来源没有特殊限制,可以是任何动物,如人、牛、猪、或马。特别优选使用广泛使用的牛血清白蛋白。在第一步的反应液中上述白蛋白的浓度优选 0.1 到 5.0g/dl,更优选 0.3 到 3.0g/dl。

[0055] 在随后的第二步中,定量试验样品中剩余的胆固醇。这可通过例如,添加至少对 LDL 起作用的表面活性剂以及定量由在第一步中添加的胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶所产生的过氧化氢来完成。可通过包括 4-氨基安替比林和基于酚或苯胺的氢供体化合物之间使用过氧化物酶的氧化和缩合反应将过氧化氢转化成有色醌,然后在 400nm 和 700nm 之间的波长测量反应产物的方法定量过氧化氢。当在第一步的反应中也产生有色醌时,在第二步中所测得的有色醌的吸光度除包括在第二步中所产生的有色醌的吸光度外,还包括在第一步中所产生的有色醌吸光度。这个吸光度反映生物样品所含 LDL 中胆固醇的现有量,也代表生物样品中所有脂蛋白中的胆固醇的现有量。另一方面,当在第一步的反应中产生 NADH 时,在不同于 NADH 的吸光度的波长测量有色醌的吸光度。因此,在第二步的反应中所产生的有色醌的吸光度代表生物样品所含 LDL 中胆固醇的现有量。在第二步的反应中所产生的有色醌的吸光度和在第一步的反应中所产生的 NADH 吸光度的总和代表生物样品中总胆固醇的现有量。此外,使胆固醇酯酶和胆固醇脱氢酶作用于它们的靶脂蛋白,可在 340nm 的波长测量所产生的 NADH(还原的  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)。当在第一步的反应中也产生 NADH 时,在第二步中所测得的 NADH 的吸光度除包含在第二步的反应中所产生的 NADH 的吸光度外,还包括在第一步的反应中所产生的 NADH 的吸光度。这个吸光度反映生物样品所含 LDL 中胆固醇的现有量,也代表生物样品中的所有脂蛋白中胆固醇的现有量。另一方面,当在第一步的反应中产生有色醌时,在不同于有色醌的吸光度的波长下测量 NADH 的吸光度。因此,在第二步的反应中所产生的 NADH 吸光度代表生物样品所含 LDL 中胆固醇的现有量。在第二步的反应中所产生的 NADH 吸光度和在第一步的反应中所产生的有色醌吸光度的总和代表生物样品中总胆固醇的现有量。

[0056] 这里,至少对 LDL 起作用的表面活性剂可以是选择性地仅作用于 LDL 的表面活性剂,或者可以是对所有脂蛋白起作用的表面活性剂。

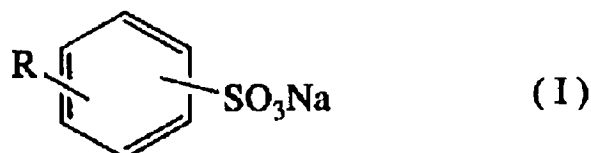
[0057] 这种对所有脂蛋白起作用的表面活性剂的优选实例是 HLB 值 11 以上、13 以下,优选 12 以上、13 以下的聚环氧烷衍生物。这种衍生物的实例包括具有高级醇的缩合产物、具有高级脂肪酸的缩合产物、具有高级脂肪酸酰胺的缩合产物、具有高级烷基胺的缩合产物、具有高级烷基硫醇的缩合产物、以及具有烷基酚的缩合产物。

[0058] 这种 HLB 值 11 以上、13 以下的聚环氧烷衍生物的优选的具体实例包括,但不限于,HLB 值 11 以上、13 以下的化合物,如聚氧化乙烯十二烷基醚、聚氧化乙烯十六烷基醚、聚氧化乙烯油基醚、聚氧化乙烯高级醇醚、聚氧化乙烯辛基苯基醚、以及聚氧化乙烯壬基苯基醚。

[0059] 这种选择性地仅对 LDL 起作用的表面活性剂的实例是阴离子表面活性剂。这里所使用的阴离子表面活性剂的优选实例包括,但不特别限于,具有一个或多个芳香环的阴离子表面活性剂,其中一个或多个 C4 到 C18 的线性或分支的烷基结合到芳香环上。这里,芳香环可优选地由碳和氢构成,如苯、萘、和联苯。进一步优选所提及的具有一个或多个亲水基团,如硫酸酯结合到其上的芳香环。在下列式 (I) 到 (V) 中显示这种阴离子表面活性剂的优选实例。

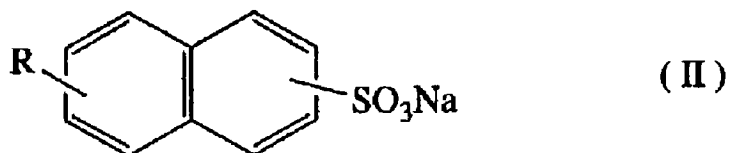
[0060] 化学式 1

[0061]



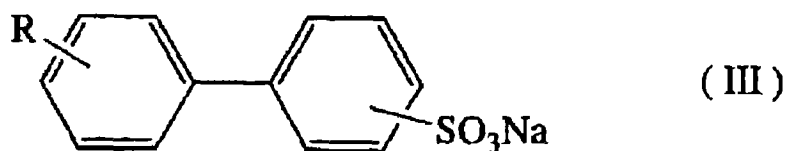
[0062] 化学式 2

[0063]



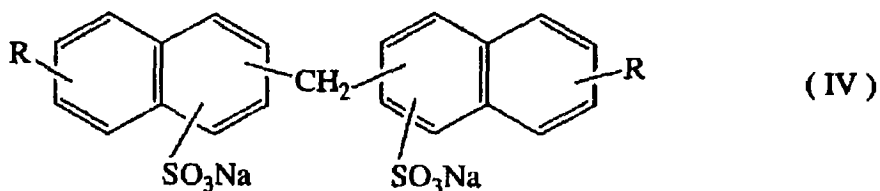
[0064] 化学式 3

[0065]



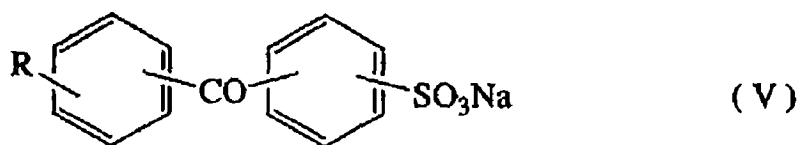
[0066] 化学式 4

[0067]



[0068] 化学式 5

[0069]



[0070] 在式 (I) 到 (V) 中,R 代表 C4 到 C18 的线性或分支的烷基。在第二步中使用的阴

离子表面活性剂的优选实例是高级醇硫酸钠。

[0071] 在第二步中使用的表面活性剂的浓度优选是大约 0.1 到 100g/l, 更优选大约 1 到 50g/l。

[0072] 第二步中其它优选的反应条件与第一步中优选的反应条件相同。

[0073] 优选地在单一反应室内连续完成第一步和第二步。通过自动分析仪自动测量第一步完成后的吸光度和第二步完成后的吸光度。

[0074] 在本发明的方法中使用的分析仪是具有同时分析多个项目功能的自动分析仪, 通过其可同时分析多个项目。

[0075] 考虑到分析仪的同时分析多个项目的功能, 可向反应室中加入第一到第四个试剂, 可将反应时间设为从 3 分钟到 20 分钟。此外, 因为在反应期间在许多情况下进行光度测定, 可设置不同的测量时间。因此, 也可以设置用于比色分析、速率分析或者比色法和速率法的组合的不同时间。此外, 在不同波长的同时测量也是可能的。通过适当设置用于分析和测量的这些条件, 可获得同时测量本发明所述的多个项目。

[0076] 可使用具有这种同时分析多个项目功能的商品化的自动分析仪。

[0077] 本发明进一步包括试剂组合物, 其是同时测定生物样品中所含 LDL 中的的胆固醇和总胆固醇的试剂盒。本发明所述的试剂组合物含有对除 LDL 外的脂蛋白起作用的表面活性剂、至少对 LDL 起作用的表面活性剂、胆固醇酯酶、以及胆固醇氧化酶。通过使用该试剂组合物, 可测量由反应所产生的有色醌的吸光度。此外, 本发明的试剂组合物含有对除 LDL 外的脂蛋白起作用的表面活性剂、至少对 LDL 起作用的表面活性剂、胆固醇酯酶、以及胆固醇脱氢酶。通过使用该试剂组合物, 可测量由反应所产生的 NADH 的吸光度。本发明的试剂组合物进一步含有已知浓度的标准脂蛋白溶液、缓冲液等。

[0078] 本说明书包括在日本专利申请 No. 2002-362970 的说明书和 / 或附图中所公开的部分或全部内容, 其是本申请的优先权文件。

[0079] 附图简述

[0080] 图 1. 显示本发明的多重定量方法的原理。

[0081] 图 2. 显示通过本发明的多重定量方法测得的 LDL 中胆固醇水平和独立测得的 LDL 中胆固醇水平之间的相关性。

[0082] 图 3. 显示通过本发明所述的多重定量方法测得的总胆固醇水平和独立测得的总胆固醇水平之间的相关性。

[0083] 实施本发明的最佳方式

[0084] 基于本发明的实施例将给出具体解释。然而, 本发明不受下列实施例限制。

[0085] (试剂)

[0086] 制备具有下列组成的试剂, 用于同时测量 LDL 胆固醇和总胆固醇。

[0087] 第一试剂

[0088] PIPES 缓冲液 pH7.0 50mmol/l

[0089] HDAOS 0.7mmol/l

[0090] 4-氨基安替比林 1.5mmol/l

[0091] 胆固醇酯酶 0.8IU/ml

[0092] 胆固醇氧化酶 0.5IU/ml

- [0093] 过氧化物酶 1.0 单位 /ml
- [0094] 氯化镁 10mmol/l
- [0095] EMULGEN B66 表面活性剂 (Kao 0.2%
- [0096] Chemical Company)
- [0097] 第二试剂
- [0098] PIPES 缓冲液 pH7.0 50mmol/l
- [0099] TritonX100 3.0%
- [0100] 作为接受评估的对照产品,使用用于自动分析的 LDL-EX N 试剂 (DENKA SEIKEN CO., LTD 生产的商品化产品) 和用于自动分析的 T-CHO(S)N 试剂 (DENKA SEIKEN CO., LTD 生产的商品化产品)。
- [0101] (样品)
- [0102] 制备 30 份人血清样品。
- [0103] TBA-30R(TOSHIBA CORPORATION) 用作自动分析仪。
- [0104] (LDL-C 和 T-CHO 试剂用于自动测量 (多试剂))
- [0105] 测量条件:多项的同时分析
- [0106] 将在 37°C 预热的 300  $\mu$ l 第一试剂与 4  $\mu$ l 的每种样品混合,随后在 37°C 反应 5 分钟。然后添加 100  $\mu$ l 第二试剂,反应进行 5 分钟,然后在 600nm 测量吸光度。通过从添加第二试剂后测得的吸光度中减去添加第一试剂后测得的吸光度完成 LDL 胆固醇 (LDL-C) 测量。通过测量添加第二试剂后的吸光度完成总胆固醇 (T-CHO) 测量。通过将 these 吸光度与以前测得的已知浓度样品的吸光度比较,计算 LDL-C 和 T-CHO 的浓度。
- [0107] (用于比较的对照试剂)
- [0108] 测量条件 (在相同条件下分别测量 LDL-C 和 T-CHO)
- [0109] 将在 37°C 预热的 300  $\mu$ l 第一试剂与 4  $\mu$ l 的每种样品混合,随后在 37°C 反应 5 分钟。然后添加 100  $\mu$ l 第二试剂,反应进行 5 分钟,然后在 600nm 测量吸光度。通过从添加第二试剂后测得的吸光度中减去添加第一试剂后测得的吸光度完成测量。通过将 these 吸光度与以前测得的已知浓度样品的吸光度比较,计算浓度。
- [0110] 如在图 2 和 3 中所示,根据本方法的同时定量,获得与通过分别测量 LDL-C 和 T-CHO 所获得的结果相似的测量结果。
- [0111] 在此将这里所引用的所有出版物、专利、以及专利申请全部引入作为参考。
- [0112] 工业应用性
- [0113] 本发明的方法使仅用一次测量同时定量 LDL 胆固醇和总胆固醇成为可能。

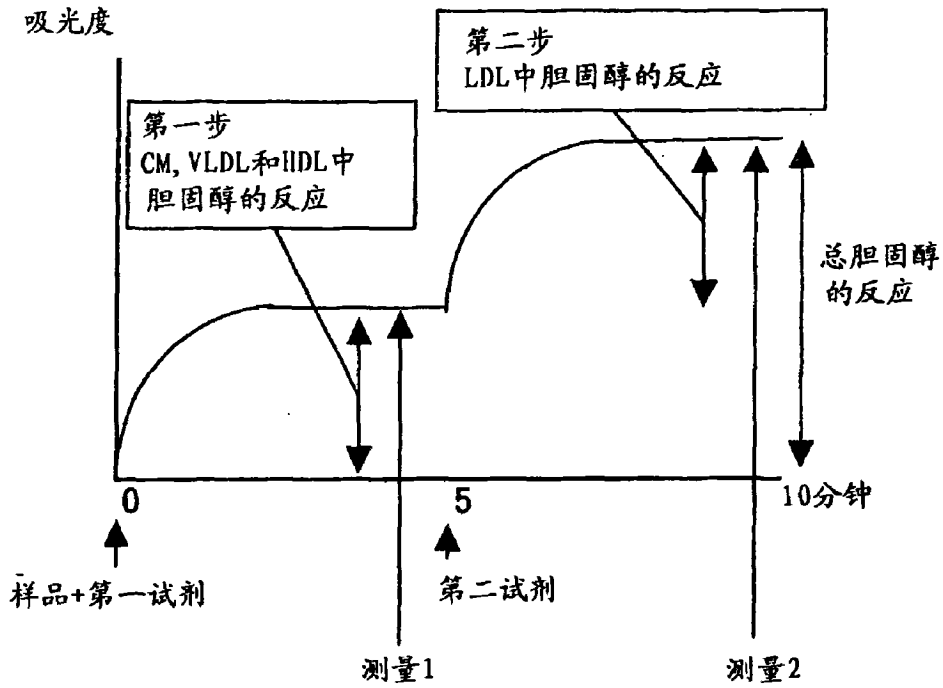


图 1

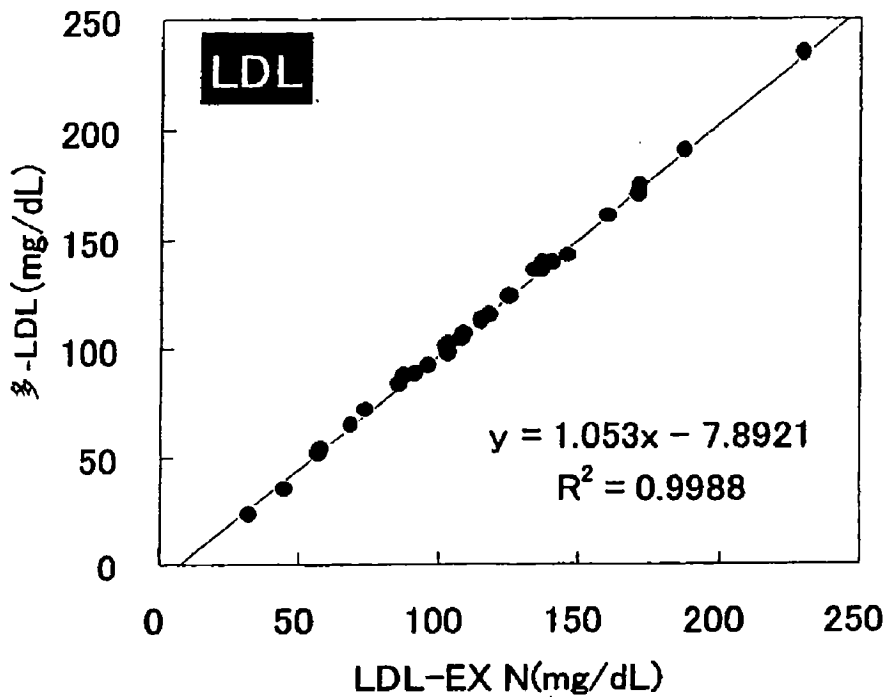


图 2

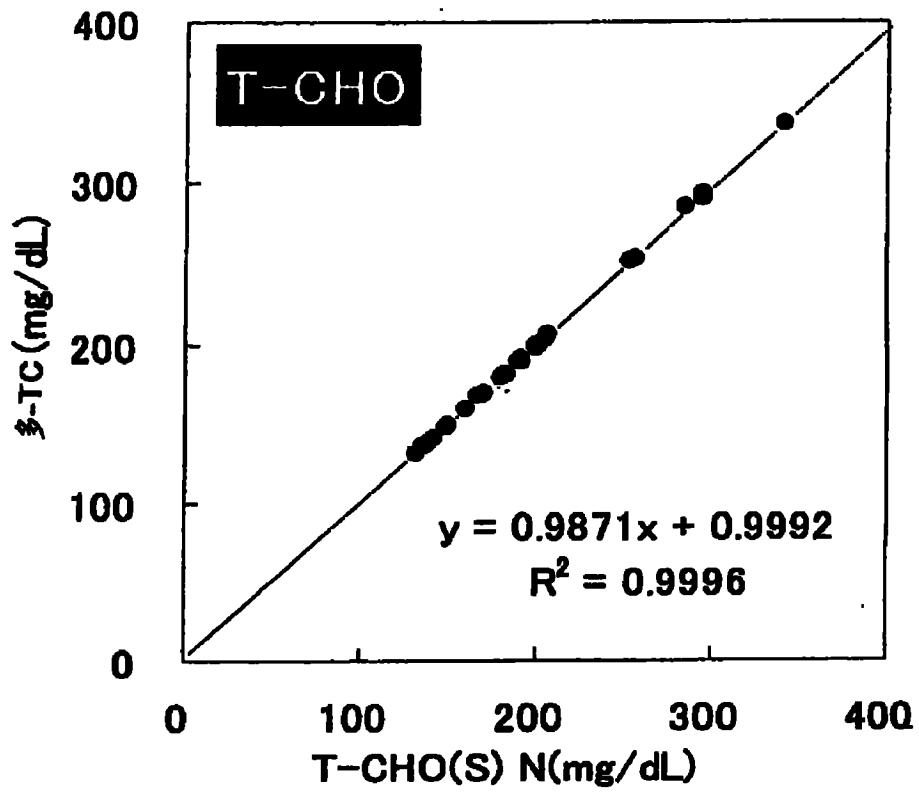


图 3