



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116075594 A

(43) 申请公布日 2023.05.05

(21) 申请号 202180061542.8

(22) 申请日 2021.09.10

(30) 优先权数据

2020-152539 2020.09.11 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/033235 2021.09.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/054890 JA 2022.03.17

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 町田聪 大迫洸树 山本浩志

早川友梨

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

专利代理师 柴云峰 张莹

(51) Int.Cl.

G12Q 1/26 (2006.01)

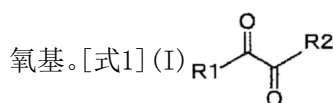
权利要求书2页 说明书20页

(54) 发明名称

减少测量误差的方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种用于通过酶法测量样品中待测物的方法,该测量方法能够抑制源自样品的过氧化物的正影响。更具体地,本发明的目的是提供一种测量方法和测量试剂,该测量方法和测量试剂能够抑制值的升高,而不管样品是否为无过氧化氢酶的样品。本发明提供一种测量方法,其通过在选自自由下式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物的存在下使样品与酶接触,而不受来自样品的影响,从而能够准确地定量源自待测物的过氧化氢,其中R1和R2相同或不同,并且各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任



1. 一种通过对样品中待测成分与酶反应产生的过氧化氢进行定量测量待测成分的方法,所述测量方法包括:

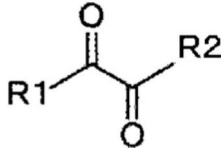
(A) 在选自由以下通式 (I) 表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物,和组氨酸组成的组中的至少一种化合物的存在下,通过使样品与酶接触产生过氧化氢;

(B) 在过氧化物酶的存在下,将产生的过氧化氢与着色剂反应;和

(C) 检测颜色变化:

[式1]

(I)



其中R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

2. 根据权利要求1所述的测量方法,其中式 (I) 中的R1和R2各自为氢、具有1至4个碳原子的直链烷基、苯基或具有1至4个碳原子的烷氧基。

3. 根据权利要求1所述的测量方法,其中式 (I) 中的R1和R2中的任一个为氢或甲基,另一个为选自由氢、甲基、乙基、苯基、甲氧基和乙氧基组成的组中的任一个。

4. 根据权利要求1所述的测量方法,其中,式 (I) 表示的化合物为苯乙二醛、乙二醛、丁二酮、2,3-戊二酮、丙酮酸甲酯或丙酮酸乙酯。

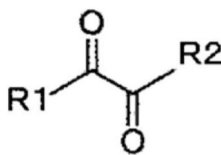
5. 根据权利要求1所述的测量方法,其中,所述在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物为2-氨基苯并咪唑。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的测量方法,其中,所述待测成分为HbA1c。

7. 一种测量试剂,其包含作用于待测成分而产生过氧化氢的酶、着色剂、过氧化物酶和选自由下述通式 (I) 表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物:

[式1]

(I)



其中R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基,或具有1至6个碳原子的烷氧基。

8. 根据权利要求7所述的测量试剂,其中式 (I) 中的R1和R2各自为氢、具有1至4个碳原子的直链烷基、苯基或具有1至4个碳原子的烷氧基。

9. 根据权利要求7所述的测量试剂,其中式 (I) 中的R1和R2中的任一个为氢或甲基,另一个为选自由氢、甲基、乙基、苯基、甲氧基和乙氧基组成的组中的任一个。

10. 根据权利要求5所述的测量试剂,其中,式 (I) 表示的化合物为苯乙二醛、乙二醛、丁二酮、2,3-戊二酮、丙酮酸甲酯或丙酮酸乙酯。

11. 根据权利要求7所述的测量试剂,其中,所述在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物为2-氨基苯并咪唑。

12. 根据权利要求7至11中任一项所述的测量试剂,其中,所述待测成分为HbA1c,所述作用于待测成分而产生过氧化氢的酶为蛋白酶和果糖基肽氧化酶。

13. 一种测量试剂盒,其包含作用于待测成分以产生过氧化氢的酶、着色剂、过氧化物酶和至少一种化合物,

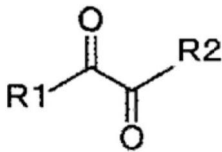
所述试剂盒包含:第一试剂和第二试剂

其中所述第一试剂包含选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物,和组氨酸组成的组中的至少一种化合物;并且

所述第二试剂包括所述酶:

[式1]

(I)



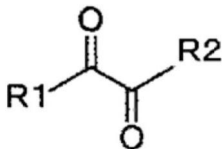
其中R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基,或具有1至6个碳原子的烷氧基。

14. 一种降低用于测量待测成分的方法中测量误差的方法,所述方法通过避开源自样品中所含待测成分以外的组分的过氧化氢的影响,并通过酶法定量源自待测成分的过氧化氢,其包括:

使样品与选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物,和组氨酸组成的组中的至少一种化合物接触:

[式1]

(I)



其中R1和R2相同或不同,并且各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基,或具有1至6个碳原子的烷氧基。

减少测量误差的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于酶法测定样品中待测物的方法。更具体地,本发明涉及一种测量方法,该测量方法用于通过定量由样品中的待测物与酶的反应产生的过氧化氢来定量待测物。

背景技术

[0002] 在临床诊断中,已知有利用酶反应检测源自诸如全血、血清、血浆、尿的生物样本的样品中的成分量的测量方法。该测量方法是称为所谓的酶法的测量方法。测量方法包括通过样品中待测成分与酶(酶的底物是待测成分)的反应产生过氧化氢,允许着色剂在过氧化物酶(POD)存在下作用于产生的过氧化氢,并检测颜色变化以量化待测成分。

[0003] 以这样的酶法为基础测量源自生物样本的样品中的待测成分,由于操作方便等原因,常用于使用自动分析仪的连续测量中。但是,酶法是易受待测物以外的源自生物样本或试剂的成分的影响,并不利地受到使测量值高于理论值的正影响或使测量值低于理论值的负影响。

[0004] 例如,已知通过在待测成分与酶反应的“主反应”之前添加过氧化氢酶以消除源自待测成分以外的成分的过氧化氢的方法,作为解决由源自待测成分以外的成分的过氧化氢引起的测量值升高的问题的方法(专利文献1)。然而,在该方法中,叠氮化物或蛋白酶如果包含在第一试剂中,则可能使过氧化氢酶不稳定。

[0005] 表面活性剂通常用于酶法的测量试剂中,例如,为了控制酶反应性或预处理样品。取决于表面活性剂的类型,表面活性剂在试剂保存过程中容易产生过氧化物。在这种情况下,过氧化物影响主反应,不利地仍然导致测量值升高。作为解决该方法的方法,已知有通过在含有 α -酮酸的水溶液中进行酶反应以除去试剂的成分中所含的过氧化物,从而防止待测物引起的过氧化氢的定量对颜色变化的影响的方法(专利文献2)。

[0006] 过氧化氢酶缺乏症或缺过氧化氢酶血症,或Takahara病于1946年由Takahara发现,是一种常染色体隐性遗传性异常,导致过氧化氢酶几乎缺失(非专利文献1和2)。过氧化氢酶不包含在患有过氧化氢酶缺乏症或缺过氧化氢酶血症的患者的生物样本中(非专利文献1和2)。在这种情况下,由于内源性过氧化氢酶包含在来自没有过氧化氢酶缺乏症或缺过氧化氢酶血症的患者的生物样本中,因此患者自身的内源性过氧化氢酶消除了来自患者的生物样本中的内源性过氧化物(如果存在),使得由待测物产生的过氧化氢定量引起的颜色变化通常不受影响。然而,由于来自患有过氧化氢酶缺乏症或缺过氧化氢酶血症的患者的生物样本中不含过氧化氢酶,因此不能预先消除生物样本中包含的内源性过氧化物。因此,源自患者生物样本的内源性过氧化物(如果存在)对在酶法中归因于过氧化氢而非源自待测物的过氧化氢的颜色变化具有正影响,不利地导致测量值升高。

[0007] 本申请的发明人使用专利文献2中公开的丙酮酸(α -酮酸的一个例子)对源自患者的生物样本的这种内源性过氧化物的正影响进行了研究,结果发现该方法能够抑制源自患有过氧化氢酶缺乏症或缺过氧化氢酶血症的患者的生物样本的样品(下文中,也简称为无

过氧化氢酶样品)的值升高,而在源自健康人的生物样本中的样品或校准品等(在下文提供的实施例中描述的比较例)中测量的吸光度值被不利地降低。尽管其原因尚不清楚,但已认为 α -酮酸可能会干扰主反应本身,在主反应中,被归因为待测物的过氧化氢与过氧化物酶和着色剂反应。

[0008] 引文列表

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本专利公开号2007-236234

[0011] 专利文献2:国际公开号W02012/081539

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Kawasaki Medical Welfare Society Journal,第5卷,第1期,1995,19-29

[0014] 非专利文献2:Acta Med.Okayama,2008,第62卷,第6期,345-361

发明概要

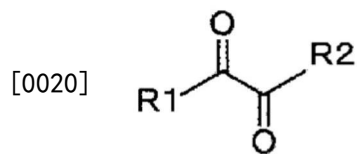
[0015] 本发明的目的在于提供一种通过酶法测量样品中的待测物的方法,该测量方法能够抑制源自样品的过氧化物的正影响。更具体而言,本发明的目的在于提供一种测量方法和测量试剂,其能够抑制无过氧化氢酶的样品的值上升而不影响来自健康人的样品或校准品的显色等。

[0016] 问题的解决方案

[0017] 本发明旨在实现上述目的。对于通过定量样品中待测成分与酶反应产生的过氧化氢来测量待测成分的方法,已经进行了深入研究以寻找能够抑制“无过氧化氢酶的样品”的值上升而不影响来自健康人的样品或校准品的显色等的化合物。结果,已经发现,通过在选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物的存在下使样品与酶接触,能够准确地定量源自待测物的过氧化氢而不受源自样品的影响,从而完成本发明:

[0018] [式1]

[0019] (I)



[0021] 其中R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

[0022] 具体而言,本发明具有以下配置。

[0023] <1>

[0024] 一种测量待测成分的方法,通过对样品中待测成分与酶反应产生的过氧化氢进行定量,该测量方法包括:

[0025] (A) 在选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物的存在下,通过使酶与样品接触产生过氧化

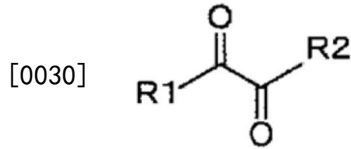
氢；

[0026] (B) 在过氧化物酶的存在下，将产生的过氧化氢与着色剂反应；和

[0027] (C) 检测颜色变化；

[0028] [式1]

[0029] (I)



[0031] 其中R1和R2相同或不同，各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基，任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

[0032] <2>

[0033] <1>所述的测量方法，其中式(I)中的R1和R2各自为氢、具有1至4个碳原子的直链烷基、苯基或具有1至4个碳原子的烷氧基。

[0034] <3>

[0035] <1>所述的测量方法，其中式(I)中的R1和R2中的任一个为氢或甲基，另一个为选自由氢、甲基、乙基、苯基、甲氧基和乙氧基组成的组中的任一个。

[0036] <4>

[0037] <1>所述的测量方法，其中，式(I)表示的化合物为苯乙二醛、乙二醛、丁二酮、2,3-戊二酮、丙酮酸甲酯或丙酮酸乙酯。

[0038] <5>

[0039] <1>所述的测量方法，其中，2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物为2-氨基苯并咪唑。

[0040] <6>

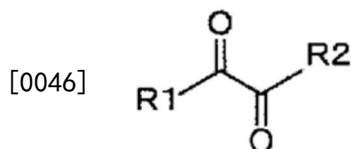
[0041] <1>至<5>中任一项所述的测量方法，其中，所述待测成分为HbA1c。

[0042] <7>

[0043] 一种测量试剂，其包含作用于待测成分而产生过氧化氢的酶、着色剂、过氧化物酶和选自由下述通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物：

[0044] [式1]

[0045] (I)



[0047] 其中R1和R2相同或不同，各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基，任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

[0048] <8>

[0049] <7>所述的测量试剂，其中式(I)中的R1和R2各自为氢、具有1至4个碳原子的直链烷基、苯基或具有1至4个碳原子的烷氧基。

[0050] <9>

[0051] <7>所述的测量试剂,其中式(I)中的R1和R2中的任一个为氢或甲基,另一个为选自由氢、甲基、乙基、苯基、甲氧基和乙氧基组成的组中的任一个。

[0052] <10>

[0053] <5>所述的测量试剂,其中,式(I)表示的化合物为苯乙二醛、乙二醛、丁二酮、2,3-戊二酮、丙酮酸甲酯或丙酮酸乙酯。

[0054] <11>

[0055] <7>所述的测量试剂,其中,2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物为2-氨基苯并咪唑。

[0056] <12>

[0057] <7>至<11>中任一项所述的测量试剂,其中,所述待测成分为HbA1c,作用于待测成分而产生过氧化氢的酶为蛋白酶和果糖基肽氧化酶(fructosyl peptide oxidase.)。

[0058] <13>

[0059] 测量试剂盒,其包含作用于待测成分而产生过氧化氢的酶、着色剂、过氧化物酶和选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物,

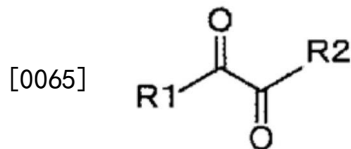
[0060] 其中

[0061] 第一试剂包括选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物,和

[0062] 第二试剂包括酶:

[0063] [式1]

[0064] (I)



[0066] 其中R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

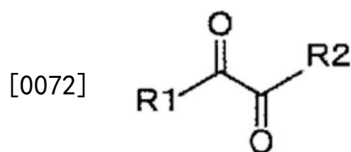
[0067] <14>

[0068] 一种降低用于测量待测成分的方法中测量误差的方法,所述方法通过避开源自样品中所含待测成分以外的组分的过氧化氢的影响,并通过酶法定量源自待测成分的过氧化氢,其包括以下步骤:

[0069] 使样品与选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种化合物接触:

[0070] [式1]

[0071] (I)



[0073] 其中R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

[0074] 发明的有益效果

[0075] 根据本发明,在基于酶法的测量方法中,通过在特定化合物的存在下进行酶反应,可以准确地定量源自待测物的过氧化氢而不受待测物以外的源自样品的成分的影响,所述测量方法通过使着色剂与通过样品中待测成分与酶反应产生的过氧化氢反应来测量待测成分。特别地,本发明可以提供一种测量方法和测量试剂,该测量方法和测量试剂可以在不影响无过氧化氢酶的样品以外的样品或诸如校准品的待测成分的显色的情况下,抑制源自无过氧化氢酶的样品中待测成分以外的成分的值升高。具体而言,无论样品是否为无过氧化氢酶样品,本发明能够通过酶法更准确地测量待测成分,而不受待测成分以外的源自样品的成分的影响。

[0076] 具体实施方式的描述

[0077] 测量方法

[0078] 本发明的测量方法是一种待测成分的测量方法,通过对样品中待测成分与酶反应产生的过氧化氢进行定量,该测量方法包括以下步骤:

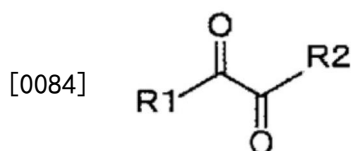
[0079] (A) 在选自由以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物和组氨酸组成的组中的至少一种特定的化合物的存在下,通过使样品与含有酶的试剂接触产生过氧化氢;

[0080] (B) 在过氧化物酶的存在下,将产生的过氧化氢与着色剂反应;和

[0081] (C) 检测颜色变化;

[0082] [式1]

[0083] (I)



[0085] 其中R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

[0086] 在步骤(A)中,通过在特定化合物存在的情况下使样品与酶接触进行的待测成分与酶的反应,可以在任何反应条件下进行,只要该条件允许产生过氧化氢,所述酶作用于待测成分产生过氧化氢。反应条件包括,例如,10至50℃,优选20至40℃,反应时间为5秒至60分钟,优选30秒至15分钟,更优选1分钟至10分钟,最优选3至5分钟。

[0087] 该反应中的特定化合物的浓度可以是任何能够通过避开源自样品中所含的待测成分以外的成分的过氧化氢的影响而降低测量误差的浓度。具体而言,在进行反应的溶液中,浓度可以为0.001至1v/v%,优选为0.01至0.5v/v%,更优选为0.05至0.3v/v%。

[0088] 配制的测量试剂中的特定化合物的浓度可以设定为进行反应的溶液中的上述浓度。

[0089] 步骤(B)中的着色剂可以在过氧化物酶存在下与过氧化氢反应生成染料。着色剂的实例包括氧化偶联型色原和无色型色原。

[0090] 无色型色原是在过氧化氢和过氧化物酶存在下单独转化为染料物质。

[0091] 无色型色原的实例包括吩噻嗪色原、三苯基甲烷色原、二苯胺色原、邻苯二胺、羟基丙酸、二氨基联苯胺和四甲基联苯胺。吩噻嗪色原是优选的。

[0092] 吩噻嗪色原的实例包括10-N-羧甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪(CCAP)、10-N-甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪(MCDP)和10-N-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪钠盐(DA-67)。吩噻嗪色原特别优选为10-N-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪钠盐(DA-67)。

[0093] 三苯基甲烷色原的实例包括N,N',N'',N''',N''''-六(3-磺丙基)-4,4',4''-三氨基三苯基甲烷(TPM-PS)。

[0094] 二苯胺色原的实例包括N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲氨基)二苯胺钠盐(DA-64)、4,4'-双(二甲氨基)二苯胺和双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲氨基苯基]胺(BCMA)。

[0095] 氧化偶联型色原是在过氧化氢和过氧化活性物质的存在下通过两种化合物的氧化偶联产生染料物质。两种化合物的组合的实例包括偶联剂和苯胺(Trinder试剂)的组合,以及偶联剂和酚的组合。

[0096] 偶联剂的实例包括4-氨基安替比林(4-AA)和3-甲基-2-苯并噻唑啉酮肼。

[0097] 苯胺的实例包括N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲苯胺(MAOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(DAOS)、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOPS)、N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(HDAOS)、N,N-二甲基-3-甲基苯胺、N,N-双(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰乙二胺(EMSE)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙酰乙二胺和N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺(F-DAOS)。

[0098] 酚的实例包括苯酚、4-氯苯酚、3-甲基苯酚和3-羟基-2,4,6-三碘苯甲酸(HTIB)。

[0099] 步骤(C)中产生的染料的颜色变化可以通过测量吸光度来检测。吸光度测量的实例包括使用分光光度计的测量方法。

[0100] 通过将步骤(C)中测量的吸光度应用于校准曲线,可以计算颜色变化作为浓度,该校准曲线使用已知浓度的待测成分制备并且表示待测成分的浓度与吸光度之间的关系。

[0101] 本发明的测量方法能够避开样品中待测成分以外的成分的正影响,并准确地定量源自待测物的过氧化氢。样品中的待测成分以外的成分的实例包括不是源自生物样本中的待测成分的过氧化物、测量试剂中含有的过氧化物和生物样本的前处理产生的过氧化物。由于来自患有过氧化氢酶缺乏症或缺过氧化氢酶血症的患者的生物样本中不含过氧化氢酶,因此生物样本中所含的内源性过氧化物(如果存在)无法预先消除,从而产生正影响。因此,本发明是特别优选的,因为可以避开这种内源性过氧化物的影响。

[0102] (样本和样品)

[0103] 用于本发明方法的样本可以是来自活体的任何样本。其实例包括全血、血清、血浆、尿、从全血中分离的红细胞,以及从全血中分离并进一步洗涤的红细胞。

[0104] 生物样本直接或在进行给定的预处理、稀释等之后用作本测量方法的样品。前处理包括在生物样本中测量待测物所需的任何前处理,例如过滤器过滤、离心、用抗凝剂处理、用防腐剂处理、以及加热或冷却处理。

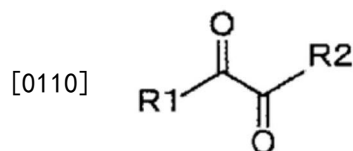
[0105] (特定化合物)

[0106] 本发明的特定化合物的实例包括以下1至3的化合物。

[0107] 1. 以下通式(I)表示的化合物

[0108] [式1]

[0109] (I)



[0111] 在式(I)中,R1和R2相同或不同,各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基,任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

[0112] 具有1至6个碳原子的直链或支链烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、戊基和己基。这种化合物的具体实例包括甲基乙二醛(R1=氢,R2=甲基,CAS编号[78-98-8]),丁二酮(R1=甲基,R2=甲基,CAS编号[431-03]-8),2,3-戊二酮(R1=甲基,R2=乙基,CAS编号[600-14-6]),3,4-己二酮(R1=乙基,R2=乙基,CAS编号[4437-51-8]),2,3-庚二酮(R1=甲基,R2=正丁基,CAS编号[96-04-8]),和5-甲基-2,3-己二酮(R1=甲基,R2=叔丁基,CAS编号[13706-86-0])。其中,优选其中R1和R2相同或不同且各自表示氢、甲基或乙基的化合物。取代基的实例包括卤素原子、甲基、氨基、磺基和羧基。

[0113] 芳基的实例包括苯基和萘基。取代基的实例包括卤素原子、甲基、氨基、磺基和羧基。这种化合物的具体实例包括苯基乙二醛(R1=氢,R2=苯基,CAS编号[1075-06-5]),1-苯基-1,2-丙二酮(R1=甲基,R2=苯基,CAS编号[579-07-7]),1-(4-氯苯基)丙烷-1,2-二酮(CAS编号[10557-21-8]),1-[4-(三氟甲基)苯基]丙烷-1,2-二酮(CAS编号[10557-13-8])和1-(4-硝基苯基)丙烷-1,2-二酮(CAS编号[6159-25-7])。其中,优选其中R1为氢或甲基、R2为苯基的化合物。

[0114] 具有1至6个碳原子的烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基和己氧基。这种化合物的具体实例包括丙酮酸甲酯(R1=甲基,R2=甲氧基,CAS编号[600-22-6]),2-氧代丁酸甲酯(R1=乙基,R2=甲氧基,CAS编号[3952-66-7]),丙酮酸乙酯(R1=甲基,R2=乙氧基,CAS编号[617-35-6]),草酸二甲酯(R1=R2=甲氧基,CAS编号[553-90-2]),2-氧代戊酸甲酯(R1=丙基,R2=甲氧基,CAS编号[6376-59-6]),草酸二乙酯(R1=R2=乙氧基,CAS编号[95-92-1])和苯甲酰甲酸甲酯(R1=苯基,R2=甲氧基,CAS编号[15206-55-0])。其中,优选易溶于水的化合物。特别地,优选其中R1和R2中的任一个为氢或甲基且另一个为甲氧基或乙氧基的化合物。

[0115] 在上述式(I)表示的化合物中,更优选地,R1和R2各自为氢、具有1至4个碳原子的直链或支链烷基、任选具有取代基的苯基或具有1至4个碳原子的烷氧基。更优选地,R1和R2各自为氢、具有1至4个碳原子的直链或支链烷基、苯基或具有1至4个碳原子的烷氧基。更具体地说,更优选苯乙二醛(R1=氢,R2=苯基,CAS编号[1075-06-5]),乙二醛(R1=氢,R2=

氢, CAS编号[107-22-2]), 丁二酮(R1=甲基, R2=甲基, CAS编号[431-03-8]), 2,3-戊二酮(R1=甲基, R2=乙基, CAS编号[600-14-6]), 1-苯基-1,2-丙二酮(R1=甲基, R2=苯基, CAS编号[579-07-7]), 丙酮酸甲酯(R1=甲基, R2=甲氧基, CAS编号[600-22-6])或丙酮酸乙酯(R1=甲基, R2=乙氧基, CAS编号[617-35-6]), 并且还更优选苯乙二醛。

[0116] 在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物

[0117] 本发明的在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物可以是具有苯并咪唑骨架在2位被取代基取代, 并且具有抑制通过酶法测量样品中待测物的方法中源自样品的过氧化物的正影响的效果的化合物。

[0118] 与具有该效果的衍生物的2位键合的供电子取代基的实例包括氨基(-NH₂或-NR₂, 其中R为烷基)、烷氧基、烷基和芳基。

[0119] 这种化合物的实例包括在2位具有氨基作为取代基的2-氨基苯并咪唑(CAS编号[934-32-7])和在2位具有乙基作为取代基的2-乙基-1H-苯并咪唑(CAS编号[1848-84-6])。其中, 优选2-氨基苯并咪唑。

[0120] 3. 组氨酸

[0121] 本发明中使用的组氨酸是由CAS编号[71-00-1]定义的化合物。

[0122] (待测成分)

[0123] 根据本发明的酶法是一种测量方法, 其包括通过样品中待测成分与酶(酶的底物是待测成分)的反应产生过氧化氢, 允许着色剂在过氧化物酶(POD)存在下作用于产生的过氧化氢, 并检测颜色变化以定量待测成分。因此, 待测成分没有特别限定, 对通过酶反应生成的过氧化氢进行定量而能够测量的每种成分, 都可以进行测量。与待测成分反应产生过氧化氢的酶的实例包括将待测成分直接转化为过氧化氢的酶、将待测成分间接转化为过氧化氢的酶、允许待测成分直接产生过氧化氢的酶, 以及允许待测成分间接产生过氧化氢的酶。因此, 通过酶反应可测量的每一种这样的成分都能够用作本发明的待测物。

[0124] 其具体实例包括血红蛋白A1c(HbA1c)、糖白蛋白(GA)、尿酸、肌酸酐、胆固醇、甘油三酯、多胺、胆汁酸、1,5-脱水葡萄糖醇、丙酮酸、乳酸、磷脂、尿素、葡萄糖、胆碱、肌酸和游离脂肪酸。上述待测成分特异性氧化酶或其衍生物将在下文以“待测成分(酶)”的形式列举: 血红蛋白A1c(蛋白酶、果糖基氨基酸氧化酶或果糖基肽氧化酶)、GA(蛋白酶或酮胺氧化酶)、尿酸(尿酸酶)、肌酐(肌酸酐酶、肌酸酶或肌氨酸氧化酶)、胆固醇(胆固醇氧化酶)、甘油三酯(脂蛋白脂肪酶、甘油激酶或甘油-3-磷酸氧化酶)、多胺(多胺酰胺水解酶、多胺氧化酶, 或腐胺氧化酶), 胆汁酸(3- α -羟基类固醇脱氢酶或心肌黄酶), 1,5-脱水葡萄糖醇(1,5-脱水葡萄糖醇氧化酶或吡喃糖氧化酶), 丙酮酸(丙酮酸氧化酶), 乳酸(乳酸氧化酶), 磷脂(磷脂酶D或胆碱氧化酶)和尿素(尿素酰胺水解酶、丙酮酸激酶或丙酮酸氧化酶)。

[0125] 在本发明的测量方法中, 待测成分与作用于待测成分的酶反应产生过氧化氢优选在水性介质中进行。水性介质的实例包括去离子水、蒸馏水和缓冲溶液。缓冲液的pH为4.0至10.0, 优选为6.0至8.0。缓冲液中使用的缓冲剂的实例包括磷酸盐缓冲剂、硼酸盐缓冲剂和Good's缓冲剂。

[0126] 待测成分与酶的反应可以在稳定剂、防腐剂、干扰物质消除剂、反应促进剂等存在下进行。

[0127] (测量试剂)

[0128] 用于实施本发明测定方法的测量试剂配置的实例包括二试剂和三试剂试剂盒。三种试剂的实例包括由用于预处理样本的预处理液、第一试剂和第二试剂组成的配置。两种试剂的实例包括由第一试剂和第二试剂组成的配置。

[0129] 着色剂和POD分别包含在单独的试剂中,并且本发明的特定化合物成分包含在预处理液或第一试剂中。

[0130] 下面将给出试剂配方的具体方面。

[0131] (1) 血红蛋白A1c测量试剂盒

[0132] 第一试剂:蛋白酶、着色剂和本发明的特定化合物

[0133] 第二试剂:果糖基肽氧化酶和POD

[0134] (2) 糖白蛋白测量试剂盒

[0135] 第一试剂:蛋白酶、POD和本发明的特定化合物

[0136] 第二试剂:酮胺氧化酶和着色剂

[0137] 本发明的测量试剂可以与以往一样适用于各种自动分析装置。这样应用于各种自动分析装置,可以提供一种用于测量每个待测成分,同时消除了源自样品中除待测成分之外的成分的正影响的方法。

[0138] (血红蛋白A1c的测量方法和测量试剂)

[0139] 本发明的待测成分没有特别限定,并且对通过酶反应生成的过氧化氢进行定量而能够测量的每种成分,都可以进行测量。将描述在这些成分中具体测量血红蛋白A1c的情况。

[0140] 根据本发明的用于测量HbA1c的方法的实例包括使用血红蛋白A1c测量试剂盒的方法,该试剂盒包括:

[0141] 第一试剂,其包括蛋白酶、着色剂和本发明的特定化合物;以及

[0142] 第二试剂,其包括果糖基肽氧化酶和POD。

[0143] 首先,将第一试剂添加到样品中,使得HbA1c β 链的N末端糖化二肽被蛋白酶消化和切割。随后,添加第二试剂使得糖化二肽特异的氧化酶(果糖基肽氧化酶)作用于其上,然后着色剂在过氧化物酶存在下作用于产生的过氧化氢,接着进行比色法。作用于待测成分的酶以产生过氧化氢的反应在第一试剂中含有的本发明的特定化合物存在下进行。结果,可以抑制源自待测成分以外的成分的正影响。

[0144] 血红蛋白A1c通常确定为HbA1c%。“HbA1c%”通常用于临床实践,是指样本中A1c浓度与血红蛋白浓度的比率(%)。

[0145] HbA1c%的测量方法基本包括:光学测量样品中的血红蛋白浓度的第一步;光学测量样品中的HbA1c浓度的第二步;以及计算样品中HbA1c浓度与血红蛋白浓度的比率(HbA1c%)的步骤。上述血红蛋白A1c测量对应于HbA1c%测量方法的第二步。

[0146] 在A1c%的测量方法中,通过使用第一波长的光和第二波长的光分别测量吸光度来进行第一步中的样本的光学测量。使用在第二波长时获得的测量值校正在第一波长时测量的血红蛋白浓度。校正后的血红蛋白浓度用于HbA1c%计算步骤。

[0147] 对于血红蛋白浓度的测量,可以通过本领域已知的方法例如转化为高铁血红蛋白来进行使血红蛋白作为给定结构稳定吸光度的处理。为了测量HbA1c浓度,可以通过在蛋白酶的消化和切割过程中表面活性剂等的共存来进行促进糖化二肽从HbA1c β 链的消化和切

割的处理。

[0148] 在本说明书中，“第一波长”是指用于测量血红蛋白的波长，并且优选地是用于在本发明的方法的第一步中光学测量血红蛋白浓度的第一光的波长。可以从450nm到610nm的范围适当地选择第一波长。

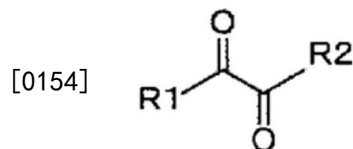
[0149] 在本说明书中，“第二波长”是指用于将在第一波长下测量的表观血红蛋白浓度校正为真实血红蛋白浓度的波长，并且优选地是用于在本发明的方法的第一步中光学测量的第二光的波长。可以从690nm至900nm的范围适当地选择第二波长。

[0150] (减少测量误差的方法)

[0151] 简而言之，本发明的测量方法也可以看作一种降低用于测量待测分的方法中测量误差的方法，所述方法通过避免源自样品中所含待测成分以外的成分的过氧化氢的影响，并通过酶法定量源自待测成分的过氧化氢来实现。根据本发明的用于降低测量误差的方法是包括以下步骤的方法：使样品接触选自以下通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物，和组氨酸组成的组中的至少一种化合物，并且各配置如上所述。

[0152] [式1]

[0153] (I)



[0155] 在式(I)中，R1和R2相同或不同，各自表示氢、具有1至6个碳原子并且任选具有取代基的直链或支链烷基，任选具有取代基的芳基或具有1至6个碳原子的烷氧基。

实施例

[0156] 在下文中，将参考实施例详细描述本发明。然而，本发明不限于以下实施例。

[0157] [参考例1]无过氧化氢酶模型样品的制备

[0158] 使用EDTA采血管从2名健康人身上各自采集的血液A或B，离心分离得到血细胞A或B。在血细胞中加入已知抑制过氧化氢酶活性的叠氮化钠水溶液制备无过氧化氢酶模型样品A或B。

[0159] [实施例1]使用无过氧化氢酶模型样品的研究

[0160] 1. 测量试剂和测量样品：

[0161] <含有蛋白酶的底物试剂(R1)>

[0162] 50mM MES pH 6.0

[0163] 1.0% Emal 20C(Kao Corp.)

[0164] Protin PC10F(Daiwa Kasei Industry Co.,Ltd.)

[0165] DA-67(10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪钠,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)

[0166] 表1至4中描述的添加剂

[0167] 表1至4中描述的添加剂的制造商和经销商表示如下。

[0168] TCI:Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.

- [0169] Kishida:Kishida Chemical Co.,Ltd.
- [0170] Fuji:FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.
- [0171] <着色试剂(R2)>
- [0172] 50mM柠檬酸pH 6.0
- [0173] 果糖基肽氧化酶(Kikkoman Corp.)
- [0174] 过氧化物酶(Toyobo Co.,Ltd)
- [0175] <测量样本>
- [0176] (1)Norudia(R)N HbA1c校准品(Sekisui Medical Co.,Ltd.)1和2
- [0177] (2)参考例1制备的无过氧化氢酶模型样品A、B
- [0178] 2. 操作
- [0179] 使用自动分析仪JCA-9130(JEOL Ltd.)以及含有表1至4所示的各种添加剂的R1试剂和R2试剂的组合,按照下述参数测量各测量样本中的HbA1c的吸光度(%)。下述时间设定是在通过加入R1开始第一反应约5分钟后加入R2的设定。
- [0180] 参数:
- [0181] [HbA1c]
- [0182] 分析方法:EPA
- [0183] 计算方法:MSTD
- [0184] 测量波长(副/主):HbA1c 805/658
- [0185] 主DET.P1-Pm-Pn:HbA1c 0-95-98
- [0186] 副DET.Pp-Pr:HbA1c 44-47
- [0187] 反应时间:10分钟
- [0188] 无样品稀释
- [0189] 反应样品量(样本量):6.4 μ L
- [0190] 第一试剂(R1)用量:60 μ L,第二试剂用量:0 μ L
- [0191] 第三试剂(R2)用量:20 μ L,第四试剂用量:0 μ L
- [0192] 3. 结果
- [0193] 计算各条件下测量的HbA1c的吸光度(%)与条件1(无添加剂)下得到的吸光度的相对值(%),如表1至4所示。校准品1或校准品2的测得的吸光度的相对值优选为接近条件1下获得的值的100%的值。无过氧化氢酶模型样品A或B的测量吸光度的相对值优选低于在条件1下获得的相对值。

[0194]

[表 1]
表 1. 测量结果

条件	添加剂	制造商和经销商	浓度 (重量%)	测得的吸光度值与条件 1 下的 相对值 (%)		
				校准品 1	校准品 2	样品 A
1	不存在	-	-	100.0	100.0	100.0
2	丙酮酸	TCI	0.10%	87.1	70.1	20.1
3			1.0%	593.2	204.3	97.7
4	2-酮戊二酸	TCI	0.10%	81.0	57.3	62.0
5			1.0%	895.6	292.4	164.8
6	乙酞丙酸	TCI	0.10%	89.4	81.3	132.1
7	苯乙二醛	TCI	0.01%	106.1	100.3	83.5
8			0.10%	110.4	92.4	21.0
9	乙二醛	TCI	0.20%	109.0	80.6	17.1
10			0.10%	101.2	98.6	89.7
11	丁二酮	TCI	0.01%	103.2	100.5	93.7
12			0.10%	116.5	100.7	59.7

[表 2]
表 2. 测量结果

条件	添加剂	制造商和经销商	浓度	测得的吸光度值与条件 1 下的 相对值 (%)		
				校准品 1	校准品 2	样品 B

[0195]

			(重量%)						
1	不存在	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
13	咪唑	Kishida	0.01%	101.4	98.5	100.3	100.5	100.5	100.5
14			0.10%	101.9	86.5	92.9	92.1	92.1	
15			0.20%	54.8	78.2	110.8	109.3	109.3	
16	苯并咪唑	Kishida	0.01%	83.3	101.1	97.9	97.1	97.1	97.1
17			0.10%	66.4	68.8	76.4	75.2	75.2	
18			0.20%	63.1	50.5	56.2	55.3	55.3	
19	2-氨基苯并咪唑	Fuji	0.01%	106.6	111.1	85.2	86.0	86.0	
20			0.10%	120.0	99.6	55.2	55.3	55.3	
21			0.20%	81.2	82.5	47.2	47.8	47.8	

[表 3]
表 3. 测量结果

[0196]

条件	添加剂	制造商和经销商	浓度 (重量%)	测得的吸光度值与条件 1 下的 相对值 (%)		
				校准品 1	校准品 2	样品 A 样品 B
1	不存在	-	-	100.0	100.0	100.0
22	甲硫氨酸	Kishida	0.10%	113.8	105.4	105 106.9
23	色氨酸	TCI	0.10%	104.9	112.6	96.6 96.4
24	L-组氨酸	Kishida	0.10%	94.5	93.4	91.7 92.0
25			0.20%	86.9	88.3	82.5 83.6

[表 4]
表 4. 测量结果

[0197]

条件	添加剂	制造商和经销商	浓度 (重量%)	测得的吸光度值与条件 1 下的 相对值 (%)			测得的吸光度值与条件 1 下的 相对值 (%)		
				校准品 1	校准品 2	样品 A	样品 B		
1	不存在	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
30	2,3-戊二酮	TCI	0.01%	101.6	100.4	93.8	93.1		
31				106.8	101.8	76.6	75.4		
32				110.9	102.6	65.9	63.8		
33	1-苯基-1,2-丙二酮	TCI	0.01%	103.9	100.8	91.7	90.6		
34	丙酮酸甲酯	TCI	0.10%	104.5	98.7	41.4	39.3		
35				100.4	100.8	87.6	86.1		
36	丙酮酸乙酯	TCI	0.10%	102.2	99.3	57.1	54.6		
37				100.7	100.3	92.9	92.0		
38	2-乙基-1H-苯并咪唑	TCI	0.01%	101.4	100.6	94.7	94.9		
39	2-氨基咪唑硫酸盐	TCI	0.10%	136.8	120.9	102.5	102.4		
40				104.7	102.6	100.7	99.9		

[0198] 3-1. 通式(I)表示的化合物

[0199] 在添加0.10%的丙酮酸(专利文献2记载的 α -酮酸)的条件2下,无过氧化氢酶模型

样品的相对吸光度值降低至20.1至22.1%，而校准品1和2的相对吸光度值也降低到70.1至87.1%，揭示了对主反应的影响。在添加1.0%的丙酮酸的条件3下，无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值降至86.2至97.7%，而校准品的相对吸光度值为204.3至593.2%，表明显色反应出现异常。在添加2-酮戊二酸(α -酮酸的类似化合物)的条件4和5下，表现出与用丙酮酸获得的行为相似的行为。在添加乙酰丙酸(3-乙酰丙酸)的条件6下，校准品的相对吸光度值降低，而无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值升高，表明显色反应出现异常。

[0200] 另一方面，在使用0.10%的苯乙二醛(在本申请中发现的化合物)的条件8下，无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值降低至21.0至21.6%，而校准品1和2的相对吸光度值保持在92.4至110.4%。在使用0.20%的苯乙二醛的条件9下，无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值降至17.1至17.5%，而校准品1和2的相对吸光度值保持在80.6至109.0%。在添加0.01%的苯乙二醛的条件7下，仅无过氧化氢酶模型样品的吸光度也降低，而校准品的吸光度没有降低。特别是，条件8和9下无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值与条件2下的相对吸光度值相当，尽管条件8和9优于条件2，因为校准品1和2的相对吸光度值保持不变。

[0201] 同样，对于乙二醛(条件10)、丁二酮(条件11和12)、2,3-戊二酮(条件30、31和32)、1-苯基-1,2-丙二酮(条件33)、具有通式(I)所示化学结构的丙酮酸甲酯(条件34和35)和丙酮酸乙酯(条件36和37)，无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值也降低，而校准品1和2的相对吸光度值被维持。

[0202] 因此，发现具有通式(I)结构的化合物组是具有本发明预期的功能的化合物，所述功能为特异性地消除样品中的内源性过氧化物，同时不影响归因于由待测物质产生的过氧化氢的主反应。

[0203] 3-2. 在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物

[0204] 将讨论条件13至21和38至40。在添加咪唑的情况下，0.01% (条件13) 不会导致任何校准品和无过氧化氢酶模型样品的吸光度发生变化。在添加0.1至0.2% (条件14和15) 的情况下，校准品的相对吸光度值的下降速率大于无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值的下降速率，表明这些浓度不适合测量。在添加0.01%至0.2%的苯并咪唑(条件16至18)的情况下，所有浓度均降低了无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值，但是，更多地降低了校准品的相对吸光度值，表现出类似于用咪唑得到的行为。另一方面，在添加0.01%至0.2%的本申请中发现的2-氨基苯并咪唑(条件19至21)的情况下，与校准品的相对吸光度值相比，所有浓度均显著降低了无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值。在添加0.01%的2-乙基-1H-苯并咪唑(条件38)的情况下，校准品的相对吸光度值也保持在100.6至101.4%，而样品的相对吸光度值降低。因此，发现该化合物具有本发明预期的功能。至于2-氨基咪唑硫酸盐(条件39和40)，样品的相对吸光度值没有降低，表明苯并咪唑骨架对于具有本发明功能的化合物是必需的。

[0205] 因此，发现在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物是具有本发明预期的功能的化合物，所述功能为特异性地消除样品中的内源性过氧化物，同时不影响归因于由待测物质产生的过氧化氢的主反应。

[0206] 3-3. 组氨酸

[0207] 将讨论条件22至25。在添加0.1%的甲硫氨酸的条件22和添加0.1%的色氨酸的条件23下，无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值几乎没有变化。另一方面，在添加L-组氨酸

的条件24和25下,无过氧化氢酶模型样品的相对吸光度值降低,且该下降率大于校准品相对吸光度值的下降率。

[0208] 因此,发现氨基酸中的组氨酸是具有本发明预期功能的化合物。

[0209] 4. 评价结果

[0210] 另外,表1至4所示的相对值的评价结果示于表5。

[0211] 评价标准如下。

[0212] 4-1. 校准品评价标准

[0213] A: 校准品1和2的测得的吸光度相对值均为90至110%。

[0214] B: 校准品1和2的测得的吸光度相对值均为80至120%。

[0215] C: 校准品1和2的测得的吸光度相对值之一小于80%或大于120%。

[0216] 由于校准品1和2的测得吸光度的相对值优选接近于在不存在添加剂的情况下获得的吸光度的100%,因此可以得出结论,A是最优选的,B是次优选的,C不是优选的。

[0217] 4-2. 样品评价标准

[0218] 在校准品评价为A或B的条件下,评价标准如下。

[0219] A: 样品A和B的相对值均为60%以下。

[0220] B: 样品A和B的相对值均为90%以下。

[0221] C: 样品A和B的相对值均为95%以下。

[0222] D: 样品A和B的相对值均为大于95%。

[0223] 由于无过氧化氢酶模型样品A和B的测得的吸光度的相对值优选低于条件1下获得的相对值,因此得出结论A是最优选的,B是次优选的,然后是C,D达不到要求的性能。关于评价为“C”的校准品的结果被排除在样品评价之外(在表中用“-”表示)。

[0224] 4-3. 综合评价标准

[0225] 基于校准品和样品的评价,综合评价标准如下。

[0226] A: 校准品和样品均评价为A。

[0227] B: 校准品为A,样品为B,或校准品为B,并且样品为A或B。

[0228] C: 校准品为A或B,样品为C。

[0229] D: 校准品为C或样品为D。

[0230] 综合评价得出A是最优选的,B为次优选的,然后是C,D是无效的。条件14根据标准本应综合评价为C,但由于样品A、B的相对值高于校准品2的相对值,综合评价为D。

[0231] 4-4. 讨论

[0232] 由表5可知,涉及综合评价为A的苯乙二醛、丙酮酸甲酯和丙酮酸乙酯是最优选的化合物。涉及评价B的乙二醛、丁二酮、2-氨基苯并咪唑、组氨酸和2,3-戊二酮是优选的化合物。

[0233] 这些结果表明,通过其存在于通过酶法测量样品中待测成分的方法中的测量系统中,本发明中发现的由通式(I)表示的化合物、在2位具有供电子取代基的苯并咪唑衍生物或组氨酸特异性地消除了样品中的内源性过氧化物,同时不影响由待测成分产生的过氧化氢引起的主反应。

[0234] [表5]

[0235] 表5. 每种化合物的评估结果

[0236]

条件	浓度 (重量%)	添加剂 不存在	校推品评价	样品评价	综合评价
1	-		-	-	-
2	0.10%	丙酮酸	C	-	D
3	1.0%		C	-	D
4	0.10%	2-酮戊二酸	C	-	D
5	1.0%		C	-	D
6	0.10%	乙酰丙酸	B	D	D
7	0.01%	苯乙二醛	A	B	B
8	0.10%		B	A	B
9	0.20%		A	A	A
10	0.10%	乙二醛	A	B	B
11	0.01%	丁二酮	A	C	C
12	0.10%		B	A	B
13	0.01%	咪唑	A	D	D
14	0.10%		B	C	D
15	0.20%		C	-	D
16	0.01%	苯并咪唑	B	D	D
17	0.10%		C	-	D
18	0.20%		C	-	D
19	0.01%		B	B	B
20	0.10%	2-氨基苯并咪唑	B	A	B
21	0.20%		B	A	B
22	0.10%	甲硫氨酸	B	D	D
23	0.10%	色氨酸	B	D	D
24	0.10%	L-组氨酸	B	C	C
25	0.20%		B	B	B
30	0.01%		A	C	C
31	0.03%	2,3-戊二酮	A	B	B
32	0.05%		B	B	B
33	0.01%	1-苯基-1,2-丙二酮	A	C	C
34	0.10%	丙酮酸甲酯	A	A	A
35	0.01%		A	B	B
36	0.10%	丙酮酸乙酯	A	A	A
37	0.01%		A	C	C
38	0.01%	2-乙基-1H-苯并咪唑	A	C	C
39	0.10%	2-氨基咪唑硫酸盐	C	-	D
40	0.01%		A	D	D

[0237]

[参考例2] 健康人样品和过氧化氢酶缺乏症样品的测量

[0238]

使用EDTA采血管从两个健康人中各采集血液C或D, 或将过氧化氢酶缺乏症样品E

离心以获得血细胞C、D或E。

[0239] 血细胞C、D或E通过HPLC (Tosoh G11) 进一步评估,HPLC是一种对过氧化氢酶的存在或不存在不敏感的测量方法。HbA1c (%) 是健康样品C:4.95%,健康样品D:6.50%,无过氧化氢酶样品E:6.20%。

[0240] [实施例2]使用无过氧化氢酶样品的研究

[0241] 1. 测量试剂

[0242] <含有蛋白酶的底物试剂(R1-A)>

[0243] 50mM MES pH 6.0

[0244] 1.0% Emal 20C(Kao Corp.)

[0245] Protin PC10F(Daiwa Kasei Industry Co.,Ltd.)

[0246] DA-67 (10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪钠,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)

[0247] <含有蛋白酶的底物试剂(R1-B)>

[0248] 50mM MES pH 6.0

[0249] 1.0% Emal 20C(Kao Corp.)

[0250] Protin PC10F(Daiwa Kasei Industry Co.,Ltd.)

[0251] DA-67 (10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪钠,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)

[0252] 0.10% 苯乙二醛

[0253] <显色试剂(R2)>

[0254] 50mM柠檬酸pH 6.0

[0255] 果糖基肽氧化酶(Kikkoman Corp.)

[0256] 过氧化物酶(Toyobo Co.,Ltd)

[0257] 2. 测试样本

[0258] <校准品>

[0259] 使用Norudia(R)N HbA1c校准品。

[0260] <稀释剂>

[0261] 使用纯化水。

[0262] <测量样本>

[0263] 将参考例2中制备的正常样品C、D和无过氧化氢酶样品E分别用纯化水稀释26倍后进行测量。

[0264] 2. 操作

[0265] 使用自动分析仪JCA-9130(JEOL Ltd.) 以及试剂R1-A和试剂R2或试剂R1-B和试剂R2的组合,根据以下给出的参数测量每个测试样品,并计算HbA1c (%)。

[0266] 参数:

[0267] [HbA1c和Hb]

[0268] 分析方法:EPA

[0269] 计算方法:MSTD

[0270] 测量波长(副/主):HbA1c 805/658,Hb 805/478

[0271] 主DET.P1-Pm-Pn:HbA1c 0-95-98,Hb 0-44-47

[0272] 副DET.P.p-P.r:HbA1c 44-47,Hb 0-0

[0273] 反应时间:10分钟

[0274] 无样品稀释

[0275] 反应样品量(样本量):6.4 μ L

[0276] 第一试剂(R1)用量:60 μ L,第二试剂用量:0 μ L

[0277] 第三试剂(R2)用量:20 μ L,第四试剂用量:0 μ L

[0278] 3.结果

[0279] 使用R1-A(无添加剂)或R1-B(补充有苯乙二醛)作为第一试剂的测量结果如表6所示。在使用R1-A试剂的情况下,健康样品C和D能够被准确测量,而无过氧化氢酶样品E显示出急剧增加的值,即与HPLC测量值为6.20%相比,增加到15.46%。另一方面,在使用补充有本发明中发现的0.10%苯乙二醛的R1-B试剂的情况下,与HPLC值为6.20%相比,无过氧化氢酶样品的测量值为6.84%,并且是因此能够以比不含添加剂的R1-A试剂更高的准确度进行测量。在使用R1-B试剂的情况下,与HPLC值为4.95%相比,健康样品C为5.29%,与HPLC值为6.50%相比,健康样品D为6.65%。因此,可以看到值略有上升。这可能是由于在使用R1-B试剂校准时使用了针对R1-试剂优化的校准品而导致的测量误差。因此,通过优化R1-B试剂的另一个校准品,可以认为更准确的测量是可能的。

[0280] [表6]

		HbA1c 测定值 (%)		
		比较例 2	R1-A 不存在添加剂	补充有苯乙二醛
[0281]	健康样品 C	4.95	4.97	5.29
	健康样品 D	6.50	6.48	6.65
	无过氧化氢酶样品 E	6.20	15.46	6.84

[0282] 工业实用性

[0283] 本发明可以提供一种测量方法和测量试剂,其能够在基于酶法的测量方法中准确地定量源自待测物的过氧化氢,而不受除待测物之外的源自样品的成分的影响。特别是,无论样品是否为无过氧化氢酶样品,本发明能够通过酶法更准确地测量待测物,而不受待测物以外的源自样品的成分的影响。