



(21)申請案號：110133776

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/26 (2006.01)

C12Q1/28 (2006.01)

(30)優先權：2020/09/11 日本

JP2020-152539

(71)申請人：日商積水醫療股份有限公司(日本) SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (JP)
日本(72)發明人：町田聡 MACHIDA, SATOSHI (JP)；大迫洸樹 OSAKO, HIROKI (JP)；山本浩志
YAMAMOTO, KOUJI (JP)；早川友梨 HAYAKAWA, YUURI (JP)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：0 共 35 頁

(54)名稱

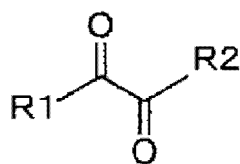
降低測定誤差之方法

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種測定方法，其在藉由酵素法來測定檢體中之測定對象之方法中，可抑制源自檢體之過氧化物之正影響。更詳細而言，本發明之課題在於提供一種不論是否為無過氧化氫酶檢體，均可抑制高值化之測定方法及測定試劑。

本發明提供一種測定方法，其於選自由以下之通式 (I) 所表示之化合物、在 2 位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物、或組胺酸所組成之群中的一種以上之化合物之存在下，使酶與檢體接觸，藉此可不受來自檢體之影響而準確地對源自測定對象之過氧化氫進行定量。

(I)



其中，式 (I) 中，R1、R2 可相同亦可不同，且表示氫、可具有取代基之碳數 1 ~ 6 之直鏈或支鏈狀烷基、可具有取代基之芳基、或碳數 1 ~ 6 之烷氧基。

無

[(發明摘要)]

[(中文發明名稱)] 降低測定誤差之方法

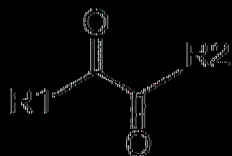
[(英文發明名稱)] 無

[(中文)]

本發明之課題在於提供一種測定方法，其在藉由脲素法來測定檢體中之測定對象之方法中，可抑制源自檢體之過氧化物之正影響。更詳細而言，本發明之課題在於提供一種不論是否為無過氧化氫酶檢體，均可抑制高值化之測定方法及測定試劑。

本發明提供一種測定方法，其於選自由以下之通式 (I) 所表示之化合物、在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物、或組胺酸所組成之群中的一種以上之化合物之存在下，使酶與檢體接觸，藉此可不受來自檢體之影響而準確地對源自測定對象之過氧化氫進行定量。

(I)



其中，式 (I) 中，R1、R2可相同亦可不同，且表示氫、可具有取代基之碳數1~6之直鏈或支鏈狀烷基、可具有取代基之芳基、或碳數1~6之烷氧基。

[(英文)]

無

[(指定代表圖)] 無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 降低測定誤差之方法

【英文發明名稱】 無

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種基於酵素法來測定檢體中之測定對象之方法。更詳細而言，本發明係關於一種測定方法，其對使檢體中之測定對象與酶進行反應而產生之過氧化氫進行定量，藉此對測定對象進行定量。

【先前技術】

【0002】 於臨床診斷中，已知有一種測定方法，其使用酶促反應對源自全血、血清、血漿、尿等生物樣本之檢體中之成分量進行檢測。本測定方法係被稱為所謂酵素法之測定方法，其係使檢體中之測定對象成分與以其作為基質之酶進行反應而生成過氧化氫，於過氧化酶（POD）之存在下使顯色劑作用於所生成之過氧化氫，檢測顯色變化，藉此進行測定對象成分之定量。

【0003】 關於此種基於酵素法對源自生物樣本之檢體中之測定對象成分進行之測定，出於操作之簡便性等理由，多用於使用自動分析裝置之連續測定中。然而，酵素法容易受到源自生物樣本或試劑之測定對象以外之成分之影響，故其問題在於會受到測定值高於理論值之正影響或測定值低於理論值之負影響。

【0004】 例如，作為解決測定值因源自測定對象成分以外之成分之過氧化氫而高值化之問題的方法，已知有如下方法：於測定對象成分與酶進行反應之「主反應」之前，先藉由添加過氧化氫酶而消除源自測定對象成分以外之成分之過氧化氫（專利文獻1）。然而，於本方法中，在第一試劑中包含疊氮化物之情形

或包含蛋白酶之情形時，有時會因其等而使過氧化氫酶變得不穩定。

【0005】 又，於酵素法之測定試劑中，多數情況下使用界面活性劑以進行酶之反應性控制、檢體之預處理等，但根據界面活性劑之種類，於試劑之保存過程中容易由該界面活性劑生成過氧化物，於此種情形時，該過氧化物會對主反應造成影響，依然存在測定值高值化之問題。針對此種問題，已知有如下方法：藉由在包含 α -酮酸之水溶液中進行酶促反應，而消除試劑中之成分中所包含之過氧化物，藉此防止對由測定對象產生之過氧化氫之定量中產生之顯色變化造成影響（專利文獻2）。

【0006】 然而，無過氧化氫酶血症（Acatlasia、Acatlasemia）或高原氏病（Takahara's disease）係高原於1946年發現之幾乎缺乏過氧化氫酶之體染色體隱性基因之體質異常（非專利文獻1、2），無過氧化氫酶血症（非專利文獻1、2）之患者之生物樣本中不包含過氧化氫酶。此處，非無過氧化氫酶血症之患者之生物樣本中包含內生性過氧化氫酶，因此於該患者之生物樣本中存在內生性過氧化物之情形時，多數情況下會利用患者本身之內生性過氧化氫酶來預先消除過氧化物，而不會對由測定對象產生之過氧化氫之定量中產生之顯色變化造成影響。然而，上述無過氧化氫酶血症之患者之生物樣本中不包含過氧化氫酶，因此無法預先消除生物樣本中所包含之內生性過氧化物。因此，於存在源自該患者生物樣本之內生性過氧化物之情形時，存在如下問題：於酵素法中，對源自測定對象之過氧化氫以外之過氧化氫之顯色變化造成正影響，而使測定值高值化。

【0007】 對於此種源自患者生物樣本之內生性過氧化物之正影響，本案發明人等使用專利文獻2中所揭示之作為 α -酮酸之一例之丙酮酸進行了研究，結果發現如下問題：雖可抑制源自無過氧化氫酶血症患者之生物樣本之檢體（以下，有時簡稱為無過氧化氫酶檢體）之高值化，但另一方面，源自健康人之生物樣本之檢體或校準品等亦發生測定吸光度值降低（本案說明書中之下述實施例中所

記載之比較例)。該理由並不明確，但認為很可能是 α -酮酸妨礙了測定對象所生成之過氧化氫、與過氧化酶及顯色劑進行反應之主反應本身。

先前技術文獻

專利文獻

【0008】 專利文獻1：日本特開2007-236234號公報

專利文獻2：國際公開WO2012/081539號說明書

非專利文獻

【0009】 非專利文獻1：川崎醫療福祉學會誌，Vol.5，NO.1，1995，19-29

非專利文獻2：Acta Med. Okayama, 2008, Vol. 62, NO. 6, 345-361

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0010】 本發明之課題在於提供一種測定方法，其於藉由酵素法來測定檢體中之測定對象之方法中，可抑制源自檢體之過氧化物之正影響。更詳細而言，本發明之課題在於提供一種測定方法及測定試劑，其可不對健康人之檢體或校準品等之顯色造成影響而抑制無過氧化氫酶檢體之高值化。

[解決課題之技術手段]

【0011】 本發明係用於解決上述課題者，對於「在『使檢體中之測定對象成分與酶進行反應而生成過氧化氫，對該過氧化氫進行定量，藉此對測定對象成分進行測定』之方法中，可不對健康人之檢體或校準品等之顯色造成影響而抑制『無過氧化氫酶檢體』之高值化的化合物」之探索進行了努力研究，結果發現，於選自由以下之通式(I)所表示之化合物、在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物、及組胺酸所組成之群中之之一種以上之化合物之存在下，使檢體與酶接觸，藉此可不受來自檢體之影響而準確地對源自測定對象之過氧化氫進行定

< 8 >

如<7>所記載之測定試劑，其中，式(I)之R1、R2為氫、碳數1~4之直鏈烷基、苯基或碳數1~4之烷氧基中之任一者。

< 9 >

如<7>所記載之測定試劑，其中，式(I)之R1或R2中之任一者為氫或甲基，另一者為選自由氫、甲基、乙基、苯基、甲氧基及乙氧基所組成之群中之任一者。

< 10 >

如<5>所記載之測定試劑，其中，式(I)所表示之化合物為苯基乙二醛、乙二醛、雙乙醯、2,3-戊二酮、丙酮酸甲酯或丙酮酸乙酯。

< 11 >

如<7>所記載之測定試劑，其中，在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物為2-胺基苯并咪唑。

< 12 >

如<7>至<11>中任一項所記載之測定試劑，其中，測定對象成分為HbA1c，作用於測定對象成分並生成過氧化氫之酶為蛋白酶及果糖基肽氧化酶(fructosyl-peptide oxidase)。

< 13 >

一種測定試劑套組，其包含作用於測定對象成分並生成過氧化氫之酶、顯色劑、過氧化酶以及選自由以下之通式(I)所表示之化合物、在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物、及組胺酸所組成之群中的一種以上之化合物，

第1試劑中包含選自由以下之通式(I)所表示之化合物、在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物、及組胺酸所組成之群中的一種以上之化合物，

第二試劑中包含酶；

數1~6之直鏈或支鏈狀烷基、可具有取代基之芳基、或碳數1~6之烷氧基。

【0014】 關於步驟(A)中之藉由在特定化合物之存在下,使作用於測定對象成分並生成過氧化氫之酶與檢體接觸而進行的測定對象成分與酶之反應,只要為生成過氧化氫之條件,便可為任意反應條件,例如為10~50°C,較佳為20~40°C,反應時間為5秒~60分鐘,較佳為30秒~15分鐘,進而較佳為1分鐘~10分鐘,最佳為3~5分鐘。

關於該反應中之特定化合物之濃度,只要為可避免源自檢體中所包含之測定對象成分以外之成分之過氧化氫的影響而降低測定誤差之濃度即可。具體而言,於供進行反應之溶液中只要為0.001~1 v/v%即可,較佳為0.01~0.5 v/v%,進而較佳為0.05~0.3 v/v%。

又,關於調劑成測定試劑時之特定化合物之濃度,以於供進行反應之溶液中成為上述濃度之方式進行調劑即可。

【0015】 步驟(B)中之顯色劑只要為於過氧化酶之存在下與過氧化氫進行反應並生成色素者即可。作為顯色劑,可例舉氧化偶合型色素原、無色(leuco)型色素原等。

【0016】 無色型色素原係指於過氧化氫及過氧化酶之存在下,單獨轉換為色素之物質。

【0017】 作為無色型色素原,例如可例舉啡噻吡系色素原、三苯甲烷系色素原、二苯胺系色素原、鄰苯二胺、羥基丙酸、二胺基聯苯胺、四甲基聯苯胺等,較佳為啡噻吡系色素原。

【0018】 作為啡噻吡系色素原,例如可例舉:10-N-羥甲基胺甲醯基-3,7-雙(二甲胺基)-10H-啡噻吡(CCAP)、10-N-甲基胺甲醯基-3,7-雙(二甲胺基)-10H-啡噻吡(MCDP)、10-N-(羥甲基胺基羧基)-3,7-雙(二甲胺基)-10H-啡噻吡鈉鹽(DA-67)等。啡噻吡系色素原中,特佳為10-N-(羥甲基胺基羧基)-3,7-雙(二甲胺

基)-10H-啡噻吡納鹽 (DA-67)。

【0019】 作為三苯甲烷系色素原，例如可例舉：N,N,N',N',N'',N''-六(3-磺丙基)-4,4',4''-三胺基三苯甲烷 (TPM-PS) 等。

【0020】 作為二苯胺系色素原，例如可例舉：N-(羧甲基胺基羰基)-4,4'-雙(二甲胺基)二苯胺鈉鹽 (DA-64)、4,4'-雙(二甲胺基)二苯胺、雙[3-雙(4-氯苯基)甲基-4-二甲胺基苯基]胺 (BCMA) 等。

【0021】 氧化偶合型色素原係指於過氧化氫及過氧化活性物質之存在下，兩種化合物進行氧化性偶合並生成色素之物質。作為兩種化合物之組合，可例舉：偶合劑 (coupler) 與苯胺類 (Trinder試劑) 之組合、偶合劑與酚類之組合等。

【0022】 作為偶合劑，例如可例舉：4-胺基安替比林 (4-AA)、3-甲基-2-苯并噻唑啉酮肼 (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine) 等。

【0023】 作為苯胺類，可例舉：N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺 (TOOS)、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺 (MAOS)、N-乙基-N-(2-羥基-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-羥基-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-雙(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)-3,5-二甲基苯胺、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀醯基乙二胺 (EMSE)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙醯基乙二胺、N-乙基-N-(2-羥基-3-磺丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺 (F-DAOS) 等。

【0024】 作為酚類，可例舉：苯酚、4-氯酚、3-甲基苯酚、3-羥基-2,4,6-三碘苯甲酸 (HTIB) 等。

【0025】 關於步驟（C）中之所生成之色素之色調變化，可藉由測定吸光度而進行檢測。關於吸光度之測定，例如可例舉使用分光光度計進行測定之方法等。

關於色調變化，可將步驟（C）中所測得之吸光度代入至校準曲線而算出濃度，該校準曲線係使用已知濃度之測定對象成分所繪製之表示測定對象成分之濃度與吸光度之關係者。

【0026】 根據本發明之測定方法，可避免源自檢體中之測定對象成分以外之成分之正影響，而準確地對源自測定對象之過氧化氫進行定量。作為檢體中之測定對象成分以外之成分，可例舉：生物樣本中之測定對象成分以外之過氧化物、測定試劑中所包含之過氧化物、因生物樣本之預處理而產生之過氧化物等。由於無過氧化氫酶血症之患者之生物樣本中不包含過氧化氫酶，故而於存在生物樣本中所包含之內生性過氧化物之情形時，無法預先將其消除，從而產生正影響，因此本發明可避免此種内生性過氧化物之影響，故特佳。

【0027】 （樣本、檢體）

作為本發明之方法中所使用之樣本，只要為源自生物體之樣本即可，可例舉：全血、血清、血漿、尿、從全血中分離之紅血球、從全血中分離且進而經洗淨之紅血球等。

生物樣本可直接用作本測定方法之檢體，或者於進行一定之預處理、稀釋等後用作本測定方法之檢體。預處理包含測定生物樣本中之測定對象所需之預處理之任一者，例如利用過濾器進行之過濾、離心分離、利用抗凝固劑進行之處理、利用防腐劑進行之處理、加熱或冷卻處理等。

【0028】 （特定化合物）

作為本發明之特定化合物，可例舉以下之1.~3.之化合物。

1.以下之通式（I）所表示之化合物

[3952-66-7])、丙酮酸乙酯 (R1 = 甲基, R2 = 乙氧基, CAS號[617-35-6])、草酸二甲酯 (R1 = R2 = 甲氧基, CAS號[553-90-2])、2-側氧基戊酸甲酯 (R1 = 丙基, R2 = 甲氧基, CAS號[6376-59-6])、草酸二乙酯 (R1 = R2 = 乙氧基, CAS號[95-92-1])、苯甲醯甲酸甲酯 (R1 = 苯基, R2 = 甲氧基, CAS號[15206-55-0])。其中, 較佳為易溶於水之化合物, 其中, 較佳為R1、R2中之任一者為氫或甲基, 且另一者為甲氧基或乙氧基之化合物。

【0033】 作為上述式 (I) 所表示之化合物, 更佳為R1、R2為氫、碳數1~4之直鏈或支鏈狀烷基、可具有取代基之苯基、碳數1~4之烷氧基中之任一者。又, 進而較佳為R1、R2為氫、碳數1~4之直鏈或支鏈狀烷基、苯基、碳數1~4之烷氧基中之任一者。更具體而言, 更佳為苯基乙二醛 (R1 = 氫, R2 = 苯基, CAS號[1075-06-5])、乙二醛 (R1 = 氫, R2 = 氫, CAS號[107-22-2])、雙乙醯 (R1 = 甲基, R2 = 甲基, CAS號[431-03-8])、2,3-戊二酮 (R1 = 甲基, R2 = 乙基, CAS號[600-14-6])、1-苯基-1,2-丙二酮 (R1 = 甲基, R2 = 苯基, CAS號[579-07-7])、丙酮酸甲酯 (R1 = 甲基, R2 = 甲氧基, CAS號[600-22-6]) 或丙酮酸乙酯 (R1 = 甲基, R2 = 乙氧基, CAS號[617-35-6]), 進而較佳為苯基乙二醛。

【0034】 2.在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物

作為本發明之在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物, 只要為下述化合物即可, 該化合物具有苯并咪唑骨架, 且2位被取代為取代基, 於藉由酵素法來測定檢體中之測定對象之方法中, 具有對源自檢體之過氧化物之正影響進行抑制之作用。

關於具有上述作用之衍生物之鍵結在2位上之推電子性取代基, 可例舉: 胺基 (-NH₂、-NR₂; 其中R為烷基)、烷氧基、烷基、芳基等。

作為此種化合物, 可例舉: 2位被取代為胺基之2-胺基苯并咪唑 (CAS號[934-32-7])、被取代為乙基之2-乙基-1H-苯并咪唑 (CAS號[1848-84-6])。其中, 較佳

為2-胺基苯并咪唑。

【0035】 3.組胺酸

本發明中所使用之組胺酸係CAS號[71-00-1]所規定之化合物。

【0036】 (測定對象成分)

本發明中之酵素法係如下測定方法：使檢體中之測定對象成分與以其作為基質之酶進行反應而生成過氧化氫，於過氧化酶(POD)之存在下使顯色劑作用於所生成之過氧化氫，對顯色變化進行檢測，藉此進行測定對象成分之定量。因此，作為測定對象成分，並無特別限定，只要是可藉由對利用酶促反應所生成之過氧化氫進行定量而測定之成分，便均可測定。作為與測定對象成分進行反應而生成過氧化氫之酶，例如可例舉：將測定對象成分直接轉換為過氧化氫之酶、將測定對象成分間接地轉換為過氧化氫之酶、由測定對象成分直接生成過氧化氫之酶、由測定對象成分間接地生成過氧化氫之酶等。因此，可藉由此種酶促反應而測定之成分均可成為本發明之測定對象。

【0037】 具體而言，可例舉：血紅蛋白A1c(HbA1c)、糖化白蛋白(GA)、尿酸、肌酸酐、膽固醇、三酸甘油酯、聚胺、膽汁酸、1,5-脫水葡萄糖醇(1,5-anhydroglucitol)、丙酮酸、乳酸、磷脂質、尿素、葡萄糖、膽鹼、肌酸、游離脂肪酸等。又，作為對於上述測定對象成分或其衍生物具有特異性之氧化酶，以「測定對象成分(酶)」之形式如下所述般進行例舉。可例舉：血紅蛋白A1c(蛋白酶、果糖基胺基酸氧化酶或果糖基肽氧化酶)、GA(蛋白酶、酮胺氧化酶)、尿酸(尿酸酶)、肌酸酐(肌酸酐酶、肌酸酶、肌胺酸氧化酶(sarcosine oxidase))、膽固醇(膽固醇氧化酶)、三酸甘油酯(脂蛋白脂酶、甘油激酶(glycerol kinase)、甘油-3-磷酸氧化酶(glycerol-3-phosphate oxidase))、聚胺(聚胺醯胺水解酶、聚胺氧化酶、腐胺氧化酶(putrescine oxidase))、膽汁酸(3- α -羥基類固醇脫氫酶、黃遞酶)、1,5-脫水葡萄糖醇(1,5-脫水葡萄糖醇氧化酶、吡喃糖氧化酶(pyranose

oxidase))、丙酮酸(丙酮酸氧化酶)、乳酸(乳酸氧化酶)、磷脂質(磷脂酶D、膽鹼氧化酶)、尿素(尿素醯胺分解酶(urea amidolyase)、丙酮酸激酶、丙酮酸氧化酶)等。

【0038】 關於本發明之測定方法中之測定對象成分、與作用於測定對象成分並生成過氧化氫之酶之反應，較佳為於水性介質中進行。作為水性介質，例如可例舉：去離子水、蒸餾水、緩衝液等。作為緩衝液之pH值，為pH4.0~10.0，較佳為pH6.0~8.0。作為緩衝液中所使用之緩衝劑，例如可例舉：磷酸緩衝劑、硼酸緩衝劑、古德緩衝劑(Good's buffer)等。

又，測定對象成分與上述酶之反應，亦可於穩定劑、防腐劑、干擾物消除劑、反應促進劑等之共存下進行。

【0039】 (測定試劑)

作為用以實施本發明之測定方法之測定試劑構成，可例舉二試劑系、三試劑系之套組。作為三試劑，可例舉由用以對樣本進行預處理之預處理液、第一試劑、第二試劑所構成之構成；作為二試劑，可例舉由第一試劑、第二試劑所構成之構成。

顯色劑及POD分別包含於不同試劑中，本發明之特定之化合物成分包含於預處理液或第一試劑中。

以下，示出具體之試劑配方之態樣。

(1)血紅蛋白A1c測定試劑套組

第一試劑 蛋白酶、顯色劑、本發明之特定化合物

第二試劑 果糖基肽氧化酶、POD

(2)糖化白蛋白測定試劑套組

第一試劑 蛋白酶、POD、本發明之特定化合物

第二試劑 酮胺氧化酶、顯色劑

本發明之測定試劑可如以往般應用於各種自動分析裝置。藉由應用於各種自動分析裝置，可提供一種將源自檢體中之測定對象成分以外之成分之正影響加以排除的各測定對象成分之測定方法。

【0040】 （血紅蛋白A1c之測定方法、測定試劑）

作為本發明之測定對象成分，並無特別限定，只要為可藉由對利用酶促反應所生成之過氧化氫進行定量而測定之成分，便均可測定，其中尤其對測定血紅蛋白A1c之情形進行說明。

作為本發明之HbA1c測定方法，例如可例舉使用以下之血紅蛋白A1c測定試劑套組之方法。

第一試劑 蛋白酶、顯色劑、本發明之特定化合物

第二試劑 果糖基肽氧化酶、POD

可例舉如下方法：首先，向檢體添加第一試劑，利用蛋白酶對HbA1c β鏈N末端之糖化二肽進行消化、切斷。繼而，添加第二試劑，使對上述糖化二肽具有特異性之氧化酶（果糖基肽氧化酶）進行作用而生成過氧化氫，於過氧化酶之存在下使顯色劑作用於該過氧化氫，進行比色定量。作用於測定對象成分並生成過氧化氫之酶之反應係於第一試劑中所包含之本發明之特定化合物的存在下進行，藉此可抑制源自測定對象成分之正影響。

【0041】 血紅蛋白A1c一般以HbA1c%之形式求出。「HbA1c%」意指臨床中通常使用之樣本中之A1c濃度相對於血紅蛋白濃度之比（%）。

HbA1c%之測定方法基本上包括：對樣本中之血紅蛋白濃度進行光學測定之第一步驟；對該樣本中之HbA1c濃度進行光學測定之第二步驟；以及算出該樣本中之HbA1c濃度相對於血紅蛋白濃度之比率(HbA1c%)之步驟。上述血紅蛋白A1c之測定相當於HbA1c%之測定方法之第二步驟。

關於A1c%之測定方法，於第一步驟中，分別使用第1波長之光及第2波長之

光來測定吸光度，藉此進行該樣本之光學測定。對於利用該第1波長所測得之血紅蛋白濃度，使用該第2波長下之測定值進行修正。將該經修正之血紅蛋白濃度用於該HbA1c%計算步驟中。

【0042】 於測定血紅蛋白濃度時，亦可進行如下處理：藉由鐵(III)肌紅蛋白化 (metmyoglobin formation) 等公知之方法使血紅蛋白成為固定結構而使吸光度穩定化。又，於測定HbA1c濃度時，亦可進行如下處理：在利用蛋白酶進行消化、切斷時，使界面活性劑等共存，藉此容易從HbA1c β 鏈對糖化二肽進行消化、切斷。

【0043】 本說明書中，「第1波長」意指用以測定血紅蛋白之波長，較佳為本發明之方法之第一步驟中的用以對血紅蛋白濃度進行光學測定之第1光之波長。該第1波長可自450 nm~610 nm之範圍內適當地進行選擇。

【0044】 本說明書中，「第2波長」意指用以將利用第1波長所測得之表觀之血紅蛋白濃度修正為真正之血紅蛋白濃度的波長，較佳為本發明之方法之第一步驟中的用以進行光學測定之第2光之波長。第2波長可自690 nm~900 nm之範圍內適當地進行選擇。

【0045】 (降低測定誤差之方法)

本發明之測定方法亦可稱為降低測定誤差之方法，該降低測定誤差之方法係下述測定方法中的降低測定誤差之方法，該測定方法係避免源自檢體中所包含之測定對象成分以外之成分之過氧化氫的影響，藉由酵素法對源自測定對象成分之過氧化氫進行定量，藉此測定上述測定對象成分。本發明之降低測定誤差之方法之特徵在於包括使選自由以下之通式 (I) 所表示之化合物、在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物、及組胺酸所組成之群中的一種以上之化合物、與檢體接觸之步驟，各構成如上所述。

富士：富士膠片和光純藥股份有限公司

【0049】 <顯色試劑 (R2) >

50 mM 檸檬酸 pH6.0

果糖基肽氧化酶 (龜甲萬公司)

過氧化酶 (東洋紡公司)

【0050】 <測定樣品 >

(1) Nordia NHbA1c校準品(Sekisui Medical股份有限公司)1、2

(2) 參考例1中所製備之無過氧化氫酶模式檢體A、B

【0051】 2.操作

使用自動分析裝置JCA-9130 (日本電子公司), 將包含表1~4中所示之各種添加劑之試劑R1與試劑R2加以組合, 利用以下測定參數對測定樣品之HbA1c (%)之吸光度進行測定。再者, 下述時間設定係添加R1開始第一反應約5分鐘後添加R2之設定。

參數：

[HbA1c]

分析方法：EPA

計算方法：MSTD

測定波長 (副/主)：HbA1c 805/658

主DET.PI-P.m-P.n：HbA1c 0-95-98

副DET.P.p-P.r：HbA1c 44-47

反應時間：10分鐘

不稀釋檢體

反應檢體量 (樣品量)：6.4 μ L

第1試劑量 (R1)：60 μ L；第2試劑量：0 μ L；

第3試劑量 (R2) : 20 μ L ; 第4試劑量 : 0 μ L

【0052】 3.結果

算出各條件下所測得之HbA1c (%)之吸光度相對條件1 (無添加劑) 下所獲得之吸光度之相對值 (%), 並示於表1~4。校準品1、校準品2之測定吸光度之相對值較佳為相對於條件1而接近100%之值。又, 無過氧化氫酶模式檢體A、B之測定吸光度之相對值較佳為相對於條件1而言較低。

【0053】 [表1]

表1.測定結果

條件	添加劑	製造經銷商	濃度 (重量%)	相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)		相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)	
				校準品1	校準品2	檢體A	檢體B
1	無	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0
2	丙酮酸	TCI	0.10%	87.1	70.1	20.1	22.1
3			1.0%	593.2	204.3	97.7	86.2
4	2-酮戊二酸	TCI	0.10%	81.0	57.3	62.0	61.7
5			1.0%	895.6	292.4	164.8	146.8
6	乙醯丙酸	TCI	0.10%	89.4	81.3	132.1	127.9
7	苯基乙二醛	TCI	0.01%	106.1	100.3	83.5	84.0
8			0.10%	110.4	92.4	21.0	21.6
9			0.20%	109.0	80.6	17.1	17.5
10	乙二醛	TCI	0.10%	101.2	98.6	89.7	89.7
11	雙乙醯	TCI	0.01%	103.2	100.5	93.7	92.9
12			0.10%	116.5	100.7	59.7	58.7

【0054】 [表2]

表2.測定結果

條件	添加劑	製造經銷商	濃度 (重量%)	相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)		相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)	
				校準品1	校準品2	檢體A	檢體B
1	無	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0
13	咪唑	岸田	0.01%	101.4	98.5	100.3	100.5
14			0.10%	101.9	86.5	92.9	92.1
15			0.20%	54.8	78.2	110.8	109.3
16	苯并咪唑	岸田	0.01%	83.3	101.1	97.9	97.1
17			0.10%	66.4	68.8	76.4	75.2
18			0.20%	63.1	50.5	56.2	55.3
19	2-胺基苯并咪唑	富士	0.01%	106.6	111.1	85.2	86.0
20			0.10%	120.0	99.6	55.2	55.3
21			0.20%	81.2	82.5	47.2	47.8

【0055】 [表3]

表3.測定結果

條件	添加劑	製造經銷商	濃度 (重量%)	相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)		相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)	
				校準品1	校準品2	檢體A	檢體B
1	無	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0
22	甲硫胺酸	岸田	0.10%	113.8	105.4	105	106.9
23	色胺酸	TCI	0.10%	104.9	112.6	96.6	96.4
24	L-組胺酸	岸田	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.測定結果

條件	添加劑	製造經銷商	濃度 (重量%)	相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)		相對於條件1之測定吸光度之相對值 (%)	
				校準品1	校準品2	檢體A	檢體B
1	無	-	-	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			0.03%	106.8	101.8	76.6	75.4
32			0.05%	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			0.01%	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			0.01%	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-胺基咪唑硫酸鹽	TCI	0.10%	136.8	120.9	102.5	102.4
40			0.01%	104.7	102.6	100.7	99.9

【0056】 3-1.關於通式 (I) 所表示之化合物

首先，於添加有0.10%之專利文獻2中所記載之作為 α -酮酸之丙酮酸之條件2下，雖然無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值降低為20.1~22.1%，但校準品1、2之吸光度相對值亦降低至70.1~87.1%，可見對主反應產生了影響。又，於添加有1.0%之丙酮酸之條件3下，雖然無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值降低至86.2~97.7%，但校準品之吸光度相對值為204.3~593.2%，故認為顯色反應產生異常。進而，添加有作為 α -酮酸之類似化合物之2-酮戊二酸之條件4、5表現

出與丙酮酸相同之舉動，於添加有乙醯丙酸（3-乙醯基丙酸）之條件6下，校準品之吸光度相對值降低，但另一方面，無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值增加，故認為顯色反應產生異常。

【0057】 另一方面，於使用作為本案中所發現之化合物之條件8：0.10%苯基乙二醛之情形時，雖然無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值降低至21.0～21.6%，但校準品1、2之吸光度相對值維持於92.4～110.4%。又，於使用條件9：0.20%苯基乙二醛之情形時，雖然無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值降低為17.1～17.5%，但校準品1、2之吸光度相對值維持於80.6～109.0%。於添加有0.01%之苯基乙二醛之條件7下，亦為校準品之吸光度不降低，而僅無過氧化氫酶模式檢體之吸光度降低。尤其是，雖然條件8、9之無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值與條件2為相同程度，但在條件8、9下校準品1、2之吸光度相對值得到維持，就該方面而言條件8、9比條件2優異。

【0058】 同樣地，於具有通式(I)所表示之化學結構之乙二醛（條件10）、雙乙醯（條件11、12）、2,3-戊二酮（條件30、31、32）、1-苯基-1,2-丙二酮（條件33）、丙酮酸甲酯（條件34、35）、丙酮酸乙酯（條件36、37）下，亦為無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值降低，另一方面，校準品1、2之吸光度相對值得到維持。

如此可知，具有通式(I)之結構之化合物群係如下化合物：特異性地消除檢體中之內生性過氧化物，另一方面，不對由測定對象物質產生之過氧化氫所引起之主反應造成影響，而具有本發明之目標功能。

【0059】 3-2.關於在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物

對條件13～21、38～40進行驗證。於添加有咪唑之情形時，在0.01%（條件13）下，對於校準品、無過氧化氫酶模式檢體中之任一者均未引起吸光度變動。於添加有0.1～0.2%之情形（條件14、15）時，相較於無過氧化氫酶模式檢體之

吸光度相對值之降低，校準品之吸光度相對值之降低幅度更大，故認為不適合測定。於添加有0.01%~0.2%之苯并咪唑之情形（條件16~18）時，在任一濃度下，均為雖然無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值發生了降低，但校準品之吸光度相對值較其降低得更甚，表現出與咪唑相同之舉動。另一方面，於添加有0.01%~0.2%之本案中所發現之2-胺基苯并咪唑之情形（條件19~21）時，在任一濃度下，均為無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值與校準品之吸光度相對值相比發生顯著降低。進而，於添加有0.01%之2-乙基-1H-苯并咪唑之情形（條件38）時，亦為校準品之吸光度相對值維持在100.6~101.4%，相對於此，檢體之吸光度相對值發生降低，從而可知其為具有本發明之目標功能之化合物。再者，至於2-胺基咪唑硫酸鹽（條件39、40），由於檢體之吸光度相對值未降低，故而認為，作為具有本發明之功能之化合物而需要苯并咪唑骨架。

如此可知，在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物係如下化合物：特異性地消除檢體中之內生性過氧化物，另一方面，不對由測定對象物質產生之過氧化氫所引起之主反應造成影響，而具有本發明之目標功能。

【0060】 3-3.關於組胺酸

對條件22~25進行驗證。於添加有0.1%之甲硫胺酸之條件22、添加有0.1%之色胺酸之條件23下，無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值幾乎未發生變動。另一方面，於添加有L-組胺酸之條件24、25下，無過氧化氫酶模式檢體之吸光度相對值發生降低，且其幅度大於校準品之吸光度相對值之降低幅度。

如此可知，胺基酸中之組胺酸係具有本發明之目標功能之化合物。

【0061】 4.判定結果

進而，將表1~4中所示之相對值之判定結果示於表5。

評價基準如下所示。

4-1.校準品之評價基準

A：校準品1、2之測定吸光度之相對值兩者均為90~110%

B：校準品1、2之測定吸光度之相對值兩者均為80~120%

C：校準品1、2之測定吸光度之相對值之一者未達80%或大於120%

校準品1、校準品2之測定吸光度之相對值較佳為相對於無添加劑而接近100%之值，因此判斷為：A最佳，B次之，C不佳。

【0062】 4-2.檢體之評價基準

於校準品之判定為A或B之條件下，檢體之評價基準如下所述。

A：檢體A、B兩者之相對值為60%以下

B：進而檢體A、B兩者之相對值為90%以下

C：檢體A、B兩者之相對值為95%以下

D：檢體A、B兩者之相對值為95%以上

無過氧化氫酶模式檢體A、B之測定吸光度之相對值較佳為相對於條件1而言較低，因此判斷為：A最佳，其次B較佳，C次之，D不具有所需性能。再者，於校準品之判定為「C」之情形時，排除在檢體評價之對象以外（表中表示為「-」）。

【0063】 4-3.綜合評價之基準

基於校準品及檢體之評價，綜合評價之基準如下所述。

A：校準品與檢體兩者均為評價A

B：校準品為A且檢體為B，或者校準品為B且檢體為A或B

C：校準品為A或B且檢體為C

D：校準品為C或檢體為D

綜合評價之判斷為：A最佳，其次B較佳，C次之，D未表現出效果。再者，關於條件14，根據該基準，其綜合評價為C，但由於檢體A、B之相對值高於校準品2，故綜合評價為D。

【0064】 4-4.考察

基於表5，包含綜合評價A之苯基乙二醛、丙酮酸甲酯、丙酮酸乙酯為最佳化合物。進而，包含評價B之乙二醛、雙乙醯、2-胺基苯并咪唑、組胺酸、2,3-戊二酮為較佳化合物。

由以上可知，關於本發明中所發現之通式(I)所表示之化合物、在2位具有推電子性取代基之苯并咪唑衍生物、或組胺酸，藉由在藉由酵素法來測定檢體中之測定對象成分之方法中使其存在於測定系統內，均會特異性地消除檢體中之內生性過氧化物，另一方面，不會對由測定對象成分產生之過氧化氫所引起之主反應造成影響。

[表5]

表5.各化合物之評價結果

	條件	濃度 (重量%)	添加劑	校準品 評價	檢體評 價	綜合評 價	
關於化合 物(1)	1	-	無	-	-	-	
	2	0.10%	丙酮酸	C	-	D	比較例
	3	1.0%		C	-	D	比較例
	4	0.10%	2-酮戊二酸	C	-	D	比較例
	5	1.0%		C	-	D	比較例
	6	0.10%	乙醯丙酸	B	D	D	比較例
	7	0.01%	苯基乙二醛	A	B	B	實施例
	8	0.10%		B	A	B	實施例
	9	0.20%		A	A	A	實施例
	10	0.10%	乙二醛	A	B	B	實施例
	11	0.01%	雙乙醯	A	C	C	實施例
	12	0.10%		B	A	B	實施例
關於苯并 咪唑	13	0.01%	咪唑	A	D	D	比較例
	14	0.10%		B	C	D	比較例
	15	0.20%		C	-	D	比較例
	16	0.01%	苯并咪唑	B	D	D	比較例
	17	0.10%		C	-	D	比較例
	18	0.20%		C	-	D	比較例
	19	0.01%	2-胺基苯并咪唑	B	B	B	實施例
	20	0.10%		B	A	B	實施例
21	0.20%	B		A	B	實施例	
關於組胺 酸	22	0.10%	甲硫胺酸	B	D	D	比較例
	23	0.10%	色胺酸	B	D	D	比較例
	24	0.10%	L-組胺酸	B	C	C	實施例
	25	0.20%		B	B	B	實施例

關於化合物(1)	30	0.01%	2,3-戊二酮	A	C	C	實施例
	31	0.03%		A	B	B	實施例
	32	0.05%		B	B	B	實施例
	33	0.01%	1-苯基-1,2-丙二酮	A	C	C	實施例
	34	0.10%	丙酮酸甲酯	A	A	A	實施例
	35	0.01%		A	B	B	實施例
	36	0.10%	丙酮酸乙酯	A	A	A	實施例
	37	0.01%		A	C	C	實施例
關於苯并咪唑	38	0.01%	2-乙基-1H-苯并咪唑	A	C	C	實施例
	39	0.10%	2-胺基咪唑硫酸鹽	C	-	D	比較例
	40	0.01%		A	D	D	比較例

【0065】 [參考例2]健康人檢體及無過氧化氫酶症檢體之測定

將使用EDTA採血管採集之2名健康人之血液C、D、及無過氧化氫酶症檢體E進行離心分離而獲得血球C、D、E。

進而，藉由不論有無過氧化氫酶均不受影響之測定法即HPLC法，對血球C、D、E進行測定(東曹G11)。關於HbA1c(%), 健康檢體C: 4.95%、健康檢體D: 6.50%、無過氧化氫酶檢體E: 6.20%。

【0066】 [實施例2]使用無過氧化氫酶檢體之研究

1.測定試劑

<含蛋白酶之基質試劑(R1-A)>

50 mM MES pH6.0

1.0% Emal 20C (花王公司)

Protin PC10F (大和化成工業公司)

DA-67 (10-(羧甲基胺基羰基)-3,7-雙(二甲胺基)啡噻吡納, 和光純藥工業公司)

【0067】 <含蛋白酶之基質試劑(R1-B)>

50 mM MES pH6.0

1.0% Emal 20C (花王公司)

Protin PC10F (大和化成工業公司)

DA-67 (10-(羧甲基胺基羰基)-3,7-雙(二甲胺基)啡噻吡納，和光純藥工業公司)

0.10% 苯基乙二醛

【0068】 <顯色試劑 (R2) >

50 mM 檸檬酸 pH6.0

果糖基肽氧化酶 (龜甲萬公司)

過氧化酶 (東洋紡公司)

【0069】 2.試驗樣本

<校準品>

使用Nordia NHbA1c校準品。

<稀釋液>

使用純化水。

<測定樣品>

利用純化水將參考例2中所製備之正常檢體C、D、無過氧化氫酶檢體E稀釋26倍而進行測定。

【0070】 2.操作

使用自動分析裝置JCA-9130 (日本電子公司)，於試劑R1-A與試劑R2、試劑R1-B與試劑R2之組合下，利用以下測定參數而測定試驗樣本，算出HbA1c (%)。

參數：

[HbA1c、Hb]

分析方法：EPA

計算方法：MSTD

測定波長 (副/主)：HbA1c 805/658、Hb 805/478

主DET.PI-P.m-P.n：HbA1c 0-95-98、Hb 0-44-47

副DET.P.p-P.r : HbA1c 44-47、Hb 0-0

反應時間：10分鐘

不稀釋檢體

反應檢體量（樣品量）：6.4 μ L

第1試劑量（R1）：60 μ L；第2試劑量：0 μ L；

第3試劑量（R2）：20 μ L；第4試劑量：0 μ L

【0071】 3.結果

將分別使用R1-A（無添加劑）、R1-B（添加苯基乙二醛）作為第一試劑進行測定所得之結果示於表6。於使用R1-A試劑之情形時，健康檢體C、D可精度較好地進行測定，另一方面，無過氧化氫酶檢體E相對於HPLC測定值6.20%而大幅地高值化為15.46%。另一方面，於使用添加有0.10%之本發明中所發現之苯基乙二醛之R1-B試劑時，相對於HPLC值6.20%，無過氧化氫酶檢體之測定值為6.84%，與未使用添加劑之R1-A試劑相比，可以相當高之精度進行測定。再者，於使用R1-B試劑之情形時，健康檢體C相對於HPLC值4.95%而略微高值化為5.29%，健康檢體D相對於HPLC值6.50%而略微高值化為6.65%。推測其為利用R1-B試劑進行校準時因使用了被調整為最適用於R1-A試劑之校準品而產生之測定誤差。因此認為，若另行將校準品調整為最適用於R1-B試劑者，則可實現進一步高精度之測定。

【0072】 [表6]

	HbA1c (%) 測定值		
	比較例2	R1-A 無添加劑	R1-B 添加苯基乙二醛
健康檢體C	4.95	4.97	5.29
健康檢體D	6.50	6.48	6.65
無過氧化氫酶檢體E	6.20	15.46	6.84

[產業上之可利用性]

【0073】 根據本發明，可提供一種在基於酵素法之測定方法中，可不受測

定對象以外之源自檢體之成分之影響而準確地對源自測定對象之過氧化氫進行定量之測定方法、測定試劑。尤其是，不論是否為無過氧化氫酶檢體，均可不受測定對象以外之源自檢體之成分之影響而藉由酵素法來準確地進行測定對象之測定。

【符號說明】

無

其中，式 (I) 中，R1、R2可相同亦可不同，且表示氫、可具有取代基之碳數1~6之直鏈或支鏈狀烷基、可具有取代基之芳基、或碳數1~6之烷氧基。