



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97195028.8

[43] 授权公告日 2003 年 7 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1116420C

[22] 申请日 1997.4.10 [21] 申请号 97195028.8

[30] 优先权

[32] 1996.5.29 [33] JP [31] 134727/1996

[86] 国际申请 PCT/JP97/01232 1997.4.10

[87] 国际公布 WO97/45553 日 1997.12.4

[85] 进入国家阶段日期 1998.11.27

[71] 专利权人 第一化学药品株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 中村光浩 中西一夫 日野浩一

真锅满久

[56] 参考文献

CN1145096A 1997.03.12 C12Q1/60

JP7-301636A 1995.11.14 C12Q1/60

审查员 周霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

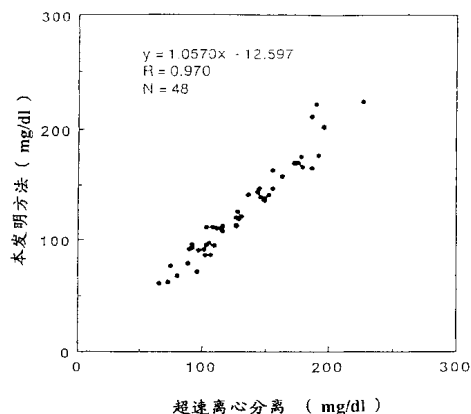
代理人 吴亦华

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称 LDL 胆固醇的定量测定方法

[57] 摘要

定量测定 LDL 胆固醇的方法，所述方法包括的步骤为将选自聚氧乙烯亚烷基苯基醚和聚氧乙烯亚烷基三苄基苯基醚的表面活性剂和测定胆固醇的酶试剂加入血清以使在脂蛋白中的高密度和极低密度脂蛋白中的胆固醇优先反应，并随后测定此后反应的胆固醇的量。该方法可以无需预处理，如离心和电泳，能够以有效、简单的方式进行定量测定，并可以应用于各种自动分析仪上。



1、定量测定低密度脂蛋白胆固醇的方法，所述方法包括的步骤为将选自聚氧乙烯亚烷基苯基醚和聚氧乙烯亚烷基三苄基苯基醚的表面活性剂和测定胆固醇的酶试剂加入血清，由此诱发在脂蛋白的高密度和极低密度脂蛋白中的胆固醇优先反应，并随后测定此后反应的胆固醇的量。

2、根据权利要求1的定量测定低密度脂蛋白胆固醇的方法，所述方法的特征在于包括以下步骤：将选自聚氧乙烯亚烷基苯基醚和聚氧乙烯亚烷基三苄基苯基醚的表面活性剂，0.002-10重量%的聚阴离子或0.01-1重量%的形成二价金属盐的物质，和测定胆固醇的酶试剂加入血清，由此诱发在脂蛋白的高密度和极低密度脂蛋白中的胆固醇优先反应，并随后测定此后反应的胆固醇的量。

3、定量测定低密度脂蛋白胆固醇的药盒，所述药盒包括测定胆固醇的酶试剂和选自聚氧乙烯亚烷基苯基醚和聚氧乙烯亚烷基三苄基苯基醚的表面活性剂。

4、按照权利要求3所述定量测定低密度脂蛋白胆固醇的药盒，所述药盒还包括聚阴离子或形成二价金属盐的物质。

## LDL胆固醇的定量测定方法

### 技术领域

本发明涉及以有效、简单方式定量和分级测定 LDL（低密度脂蛋白）胆固醇和在脂蛋白中除 LDL 外的其它的胆固醇的方法，所述方式只需要少量的试样，且无需分离处理，如离心或电泳。

### 背景技术

在血清中，脂类（如胆固醇）与脱辅基蛋白结合形成脂蛋白。根据物理性质，脂蛋白一般分为以下类型：乳糜微粒、极低密度脂蛋白（VLDL）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）等。其中，已知 LDL 是动脉硬化的诱因。

一些流行病学研究已阐明 LDL 胆固醇水平与动脉硬化类疾病的发作频率密切相关。因此，实现通过简单的常规方法测定 LDL 胆固醇对于临床来说是十分有用的。

关于测定 LDL 胆固醇的常规方法，已知的是例如，通过超速离心从其它脂蛋白中分离出 LDL 以对胆固醇进行测定的方法，以及通过电泳分离后对脂类染色测定显色强度的方法。但是，大多数这些方法无法日常使用，这是因为上述方法的操作复杂，并对处理大量样品所具有的局限性。同样已知的方法还有用与除 LDL 外的其它脂蛋白结合的抗体敏化载体，然后与试样混合，并分级分离出未与该载体结合的级分以测定其中的胆固醇。尽管该方法比上述两种方法更适于常规测定，但是，该方法涉及多个人工操作步骤，致使难以实现试验步骤的自动化，因此，仍然不适于处理大量样品。

同时，关于不借助分离手段（如超速离心或电泳）的定量和分级测定试样中脂蛋白的方法，已知的是根据分级测定在 HDL 和其它脂蛋白（即乳糜微粒、VLDL 和 LDL）中胆固醇的原则，控制所用酶（典型的是胆

固醇氧化酶和胆固醇酯酶)的反应性使其专门诱导 HDL 胆固醇进行酶反应。例如,日本专利申请特开 7-301636 公开了利用表面活性剂和糖化合物专门测定 HDL 胆固醇的方法;以及日本专利申请特开 6-242110 公开了专门测定在目标脂蛋白中胆固醇的方法,该方法是通过使除所测目标脂蛋白以外的脂蛋白凝集以便控制与酶的反应性来完成的。就实用性而言,上述方法对于所有步骤实现自动化的自动分析仪十分有用。但是,这些方法的局限在于仅仅能够定量测定从除 HDL 外的脂蛋白中分级分离出的 HDL,而不具备进一步从 VLDL 和乳糜微粒的混合物中定量和分级测定 LDL 的能力,所以,上述方法还不能达到不借助分离手段测定 LDL 胆固醇的目的。

日本专利申请特开 7-280812 公开了测定 LDL 胆固醇的方法,该方法包括的步骤是使 LDL 凝集,通过用与测定 LDL 的系统不同的系统除去其它脂蛋白中的胆固醇,将凝集的 LDL 溶解,并使 LDL 胆固醇反应。但是,与上述两个申请中描述的方法类似,日本专利申请特开 7-280812 仍未解决定量和分级测定 LDL 和 VLDL 和/或乳糜微粒的问题,而该问题对于 LDL 胆固醇的测定是绝对重要的。这类方法存在的问题还在于,由于试验需要大量步骤而不能应用在常规自动分析仪上,致使该方法的使用十分有限。

于是,就常规技术而言,不进行分离操作就不能有效测定 LDL 胆固醇,并且,也没有信息预示上述测定实施的可能性。

因此,本发明的目的是提供以简单方式有效地定量和分级测定 LDL 胆固醇的方法,所述方法无需预处理,如离心和电泳,并可应用于各种自动分析仪上。

### 技术方案

鉴于上述情况,本发明人进行了认真的研究,发现在溶解脂蛋白的特定表面活性剂存在下与测定胆固醇(cholesterol-assaying)的酶试剂进行的反应促进 HDL 胆固醇和 VLDL 胆固醇的反应而明显延缓 LDL 胆固醇的反应; HDL 胆固醇和 VLDL 胆固醇的反应比 LDL 胆固醇的反应先结

束；以及通过适当地选择测定点能够定量和分级测定 LDL 胆固醇，且使得适用于自动分析仪。基于上述发现完成本发明。

因此，本发明提供了定量测定 LDL 胆固醇的方法，所述方法包括的步骤为：将选自聚氧乙烯亚烷基(polyoxyethylenealkylene)苯基醚和聚氧乙烯亚烷基三苄基苯基醚的表面活性剂和测定胆固醇的酶试剂加入血清，由此诱发在脂蛋白的高密度和极低密度脂蛋白中的胆固醇优先反应，并随后测定此后反应的胆固醇的量。

本发明还提供了定量测定 LDL 胆固醇的方法，所述方法的特征在于包括以下步骤：将选自聚氧乙烯亚烷基苯基醚和聚氧乙烯亚烷基三苄基苯基醚的表面活性剂，显示出与 VLDL 结合比与 LDL 结合的亲和力更强的物质和测定胆固醇的酶试剂加入血清，由此诱发在脂蛋白的高密度和极低密度脂蛋白中的胆固醇优先反应，并随后测定此后反应的胆固醇的量。

另外，本发明提供了定量测定 LDL 胆固醇的药盒，所述药盒包括测定胆固醇的酶试剂和选自聚氧乙烯亚烷基苯基醚和聚氧乙烯亚烷基三苄基苯基醚的表面活性剂。

此外，本发明提供了如上所述的定量测定 LDL 胆固醇的药盒，所述药盒还进一步包括显示出与 VLDL 结合比与 LDL 结合的亲和力更强的物质。

### 附图说明

图 1 显示实施例 1 中通过本发明方法所得 LDL 胆固醇的测量值与通过超速离心所得 LDL 胆固醇的测量值的相互关系。

图 2 显示实施例 2 中通过本发明方法所得 LDL 胆固醇的测量值与通过超速离心所得 LDL 胆固醇的测量值的相互关系。

图 3 显示实施例 3 中通过本发明方法所得 LDL 胆固醇的测量值与通过超速离心所得 LDL 胆固醇的测量值的相互关系。

### 最佳实施方式

本发明使用的表面活性剂选自聚氧乙烯亚烷基苯基醚和聚氧乙烯亚

烷基三苄基苯基醚，并溶解脂蛋白。前者醚的实例包括 Emulgen A-60（Kao 公司产品），而后者醚的实例包括 Emulgen B66（Kao 公司产品）。表面活性剂既可单独使用，也可两个或多个品种结合使用。使用量取决于化合物，且没有特别的限制。在正常条件下，优选以 0.01-2 重量% 的浓度使用表面活性剂以便在所需测定时间内得到使 LDL 胆固醇检测得以进行的灵敏度，这随使用试剂的分析仪器而有所不同的。

本发明测定胆固醇的方法优选在显示出与 VLDL 结合比与 LDL 结合的亲和力更强的物质存在下进行；特别是，当样品是含乳糜微粒的血清时，加入上述物质可获得极佳的测定结果。上述物质的实例包括聚阴离子和形成二价金属盐的物质。聚阴离子的具体实例包括磷钨酸及其盐、葡聚糖硫酸盐和肝素；上述物质更具体的实例包括二价金属氯化物，如  $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、或  $NiCl_2$  或其水合物。上述物质既可单独使用，又可两个或多个品种结合使用。使用量取决于化合物，且没有特殊限制。优选地，以 0.002-10 重量% 的量使用聚阴离子，而以 0.01-1 重量% 的量使用形成二价金属离子的物质，二者都是以反应结束时浓度表示的。

表面活性剂和显示出与 VLDL 结合比与 LDL 结合的亲和力更强的物质既可分别，又可以混合物形式加入作为试样的血清中。概括地说，前者、后者和测定胆固醇的酶试剂可以分别加入；既可分别加入前者、后者和配对物与测定胆固醇的酶试剂的混合物；又可将上述三种成分的混合物以试剂形式加入。

任何已知的酶测定方法都可以用于胆固醇的测定。所述方法的实例包括将胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶结合作为酶试剂使用的方法，以及将胆固醇酯酶和胆固醇脱氢酶结合作为酶试剂使用的方法。其中优选将胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶结合使用的方法。对于这种加入上述测定胆固醇的酶试剂而后最终测定胆固醇的方法没有特别的限制，其实例包括进一步将过氧化物酶和发色团结合使用并直接测定辅酶或过氧化氢的吸光光度分析。

为了进行 LDL 胆固醇的测定，在除 LDL 外的其它脂蛋白中的胆固醇反应结束后测定有关反应的量。可以使用的方法是在反应进行特定时间后，基本上完成在除 LDL 外的其它脂蛋白中胆固醇的反应，并动态监测

随后进行的反应。或者，使用如下所述的方法，即进一步加入另外的反应促进剂以促进 LDL 反应，通过反应终点法测定由此引发的反应；并利用空白值（2 点法）校正测定值。在 2 点法中使用的反应促进剂可以包括与以较高浓度在除 LDL 外的脂蛋白中的胆固醇反应中所用的表面活性剂相同的表面活性剂以及其它类型表面活性剂。在 2 点法中，在除 LDL 外的其它脂蛋白中的胆固醇反应期间，可以将胆固醇引入从用于测定 LDL 的体系分离出的其它反应体系以专门测定 LDL 胆固醇的反应。

在血清中含有的其它脂蛋白的实例包括乳糜微粒，其一般仅在食物消化后出现。乳糜微粒与 VLDL 具有大体相同的反应性，由此，也可以与 VLDL 类似的方式促进乳糜微粒的反应性，即加入聚阴离子和形成二价金属离子的物质等；且当 VLDL 的反应完成时，乳糜微粒的反应同样也完成了；于是，通过测定随后的胆固醇的反应量可以定量和分级测定 LDL 胆固醇。

### 实施例

接下来将通过实施例进一步描述本发明，但是，不应将其理解为对本发明的限制。

#### 实施例 1

利用 Hitachi7070 型自动分析仪，通过本发明方法测定正常脂类血清样品的 LDL 胆固醇，并将测定值与通过超速离心所得测定值进行对比。结果示于图 1。

简短地说，将含有磷钨酸钠(0.02 重量%)和  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.2 重量%)的试剂加入样品(4 $\mu$ l)中。大约 5 分钟后，加入测定胆固醇的试剂(100 $\mu$ l)，该试剂含有 Emulgen A-60(Kao 公司产品)(0.5 重量%)、胆固醇酯酶(1U/ml)、胆固醇氧化酶(1U/ml)、过氧化物酶(1U/ml)、4-氨基安替比林(0.005 重量%)和 N,N-二甲基-间-甲苯胺(0.04 重量%)；并在加入第二个试剂后 1 分钟至 5 分钟期间内测定在 545nm 吸光度的变化。

使用超速离心方法时，利用超速离心机在 100,000g 将血清离心 2 小

时, 除去上层。向从所得下层收集的等分试样(1ml)中, 加入肝素溶液(40 $\mu$ l; 肝素 = 5000usp 单位/ml)和 1M MgCl<sub>2</sub>溶液(50 $\mu$ l), 并将混合物以 5000rpm 离心 30 分钟, 由此得到上清液。对通过超速离心所得下层溶液(含 LDL 和 HDL)和通过加入肝素溶液和 MgCl<sub>2</sub>溶液所得分级分离的上清液(含 HDL)进行胆固醇测定, 通过从前者中减去后者所得的值代表 LDL 胆固醇水平(参考 Paul S. Bachorik 等人, 临床化学 (Clin. Chem.) 41/10, 1414 - 1420, 1955)。

如图 1 所示, 即使本发明方法只需要少量试样并可以简单的方式进行, 本发明仍提供了与通过常规离心获得的测定值具有优异一致性的测定值。

## 实施例 2

利用 Hitachi7070 型自动分析仪, 通过本发明方法测定样品的 LDL 胆固醇, 该样品含有具有高甘油三酯水平的含乳糜微粒血清; 并将测定值与通过超速离心所得测定值进行对比。结果示于图 2。

简短地说, 将含有 Emulgen B66(Kao 公司产品)(0.5 重量%)、胆固醇酯酶(0.3U/ml)、胆固醇氧化酶(0.3U/ml)、过氧化物酶(0.3U/ml)和 4-氨基安替比林(0.002 重量%)的试剂加入样品(4 $\mu$ l)中。大约 5 分钟后, 加入含有 Triton X-100(1 重量%)和 N,N-二甲基-间-甲苯胺(0.04 重量%)的试剂(100 $\mu$ l); 并通过将第二种试剂加入前在 545nm 测得的吸光度从将其加入 5 分钟后的测得值中减去测得吸光度的变化(考虑到试剂量的改变进行校正)。

在超速离心步骤中, 重复实施例 1 所述操作。

所图 2 所示, 与实施例 1 的情况相类似, 在实施例 2 中的 LDL 胆固醇的测定值具有与通过常规离心所得测定值优异的一致性。

## 实施例 3

除了第一种试剂中进一步加入磷钨酸(0.3 重量%)以外, 使用相同样品和试剂重复实施例 2 的步骤, 并将测定值与通过超速离心所得测定值

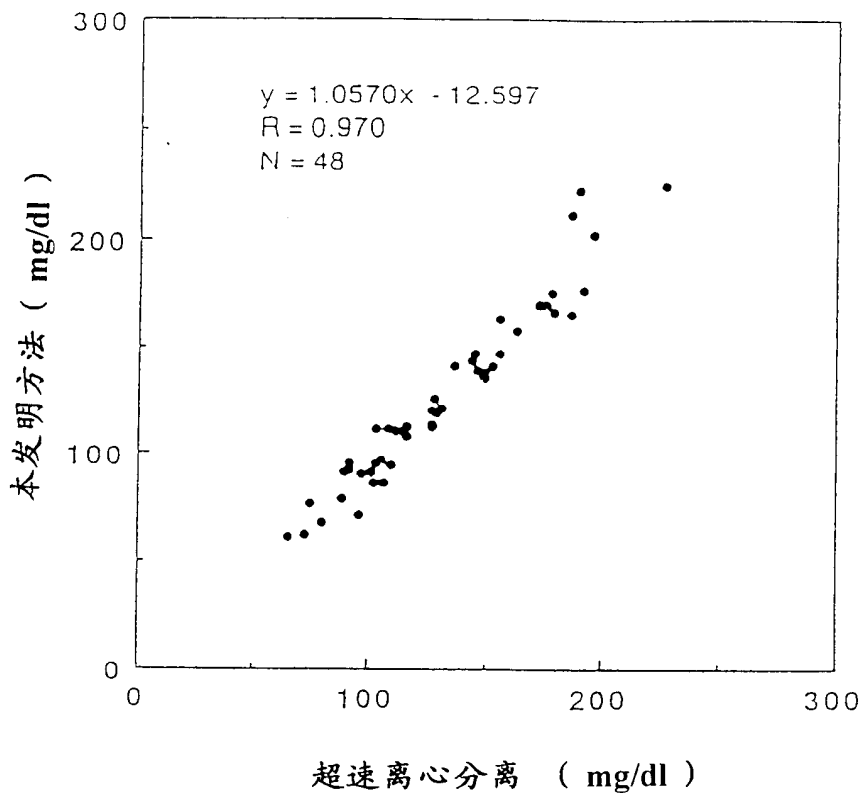
进行对比。结果示于图3。

如图3所示，与实施例1的情况相类似，在实施例3中的LDL胆固醇的测定值具有与通过常规离心所得测定值优异的一致性，即使是使用含有含乳糜微粒血清的血清样品。

#### 工业实用性

本发明不需要预处理，如离心和电泳，并能够相对于在其它脂蛋白中含有的胆固醇而言分级地定量测定LDL胆固醇，该测定以有效、简单的方式进行，并因此而可以应用于各种临床检测所用的自动分析仪上。所以，本发明在临床领域是明显有用的。

图 1



# 图 2

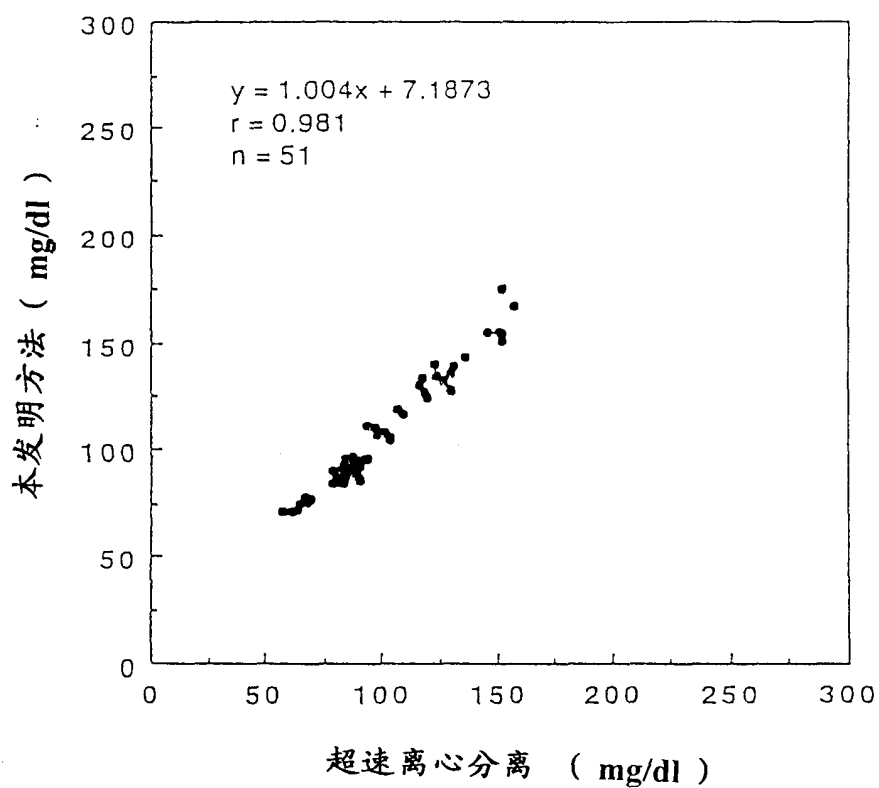


图 3

