

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480033978.2

[51] Int. Cl.
C12Q 1/26 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月20日

[11] 公开号 CN 1882696A

[22] 申请日 2004.11.18
[21] 申请号 200480033978.2
[30] 优先权
 [32] 2003.11.19 [33] JP [31] 389930/2003
[86] 国际申请 PCT/JP2004/017196 2004.11.18
[87] 国际公布 WO2005/049858 日 2005.6.2
[85] 进入国家阶段日期 2006.5.18
[71] 申请人 第一化学药品株式会社
 地址 日本东京
[72] 发明人 谷口由利子 斋藤和典

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
 代理人 沙永生

权利要求书 3 页 说明书 17 页

[54] 发明名称

含有血红蛋白的试样中的底物的测定方法

[57] 摘要

本发明提供可减弱试样中的血红蛋白的干扰、适用于各种自动分析装置的简便且有效的测定试样中的底物的方法及其测定用试剂。含有血红蛋白的试样中的底物的测定方法是通过使对应于底物的氧化酶作用，用过氧化物酶及被氧化性显色试剂光学测定生成的过氧化氢来测定试样中的底物的方法，该方法的特征在于，用选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂对含有血红蛋白的试样进行处理。

1. 含有血红蛋白的试样中的底物的测定方法，该方法通过使对应于底物的氧化酶作用，用过氧化物酶及被氧化性显色试剂光学测定生成的过氧化氢来测定试样中的底物，其特征在于，用选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂对含有血红蛋白的试样进行处理。

2. 如权利要求1所述的测定方法，其特征还在于，上述阴离子型表面活性剂为聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类或烷基磺基琥珀酸类。

3. 如权利要求1或2所述的测定方法，其特征还在于，试样中的底物为尿酸，氧化酶为尿酸酶。

4. 如权利要求1或2所述的测定方法，其特征还在于，试样中的底物为果糖基氨基酸或果糖基肽，氧化酶为果糖基氨基酸氧化酶或果糖基肽氧化酶。

5. 含有血红蛋白的试样中的底物的测定用试剂，其特征在于，包含(A)选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂，(B)作用于底物生成过氧化氢的氧化酶，以及(C)过氧化物酶及被氧化性显色试剂。

6. 糖化蛋白质、糖化肽或糖化氨基酸的浓度或它们的浓度比的测定方法，其特征在于，至少包含(1)表面活性剂，(2)对糖化蛋白质作用生成果糖基肽的蛋白酶，以及(3)对果糖基肽作用产生过氧化氢的酶。

7. 如权利要求6所述的糖化蛋白质、糖化肽或糖化氨基酸的浓度或它们的浓度比的测定方法，其特征还在于，表面活性剂为非离子型表面活性剂及/或阴离子型表面活性剂，选自聚氧乙烯衍生物、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸酯类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸类。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征还在于,磷酸酯为聚氧乙烯烷基醚磷酸的单酯、二酯或它们的混合物。

9. 如权利要求6~8中任一项所述的方法,其特征还在于,蛋白酶作用于糖化蛋白质或糖化肽而生成的果糖基肽为果糖基缬氨酰基组氨酸。

10. 如权利要求6~9中任一项所述的方法,其特征还在于,蛋白酶是来自杆菌属、曲霉属或链霉菌属的酶或通过它们的基因重组产生的酶,该蛋白酶单独或多种作用于糖化蛋白质时,至少产生果糖基缬氨酰基组氨酸。

11. 如权利要求6~10中任一项所述的方法,其特征还在于,作用于果糖基肽产生过氧化氢的酶至少以果糖基缬氨酰基组氨酸为底物。

12. 如权利要求6~11中任一项所述的方法,其特征还在于,糖化蛋白质为血红蛋白A1c。

13. 血红蛋白浓度、血红蛋白A1c浓度及血红蛋白A1c浓度比的测定方法,其特征还在于,对至少用表面活性剂进行了前处理的含有血红蛋白的试样中的血红蛋白进行测定,再使生成果糖基缬氨酰基组氨酸的蛋白酶作用于血红蛋白测定用反应液,进行血红蛋白A1c浓度测定。

14. 血红蛋白浓度、血红蛋白A1c浓度及血红蛋白A1c浓度比的测定方法,其特征还在于,包括混合含血细胞的试样和含表面活性剂的反应液,使血红蛋白从血细胞溶出的步骤;稀释该反应液,利用光学方法求出血红蛋白浓度的步骤;使蛋白酶作用于血红蛋白,至少产生果糖基缬氨酰基组氨酸的步骤;至少以果糖基缬氨酰基组氨酸为底物,使产生过氧化氢的酶作用于该底物的步骤;使过氧化氢和过氧化物酶及被氧化性显色试剂作用的步骤;测定因显色化合物的生成而造成的吸光度变化,求出血红蛋白A1c浓度的步骤;以及由血红蛋白浓度和血红蛋白A1c浓度求出血红蛋白A1c浓度比的步骤。

15. 如权利要求14所述的方法,其特征还在于,试样中的底物是果糖基缬氨酰基组氨酸或利用来自被添加于反应液的试样以外的蛋白酶产生底物的生物体成分,产生过氧化氢的酶为果糖基肽氧化酶。

16. 血红蛋白浓度、血红蛋白A1c浓度及血红蛋白A1c浓度比的测定中的试样的前处理方法,其特征还在于,使用选自聚氧乙烯衍生物、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸酯类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸类的非离子型表面活性剂及/或阴离子型表面活性剂。

17. 血红蛋白浓度测定方法,其特征还在于,在包括使血红蛋白从血细胞溶

出的步骤和求出血红蛋白浓度的步骤的血红蛋白的浓度测定中，至少使用选自聚氧乙烯衍生物、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸酯类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸类的非离子型表面活性剂及/或阴离子型表面活性剂。

18. 采用生化学自动分析装置测定血红蛋白 A1c 浓度比的方法，其特征在于，以采用生化学自动分析装置测定血红蛋白 A1c 浓度比为目的，在设定生化学自动分析装置的操作条件时，(1)分别设定血红蛋白浓度测定和血红蛋白 A1c 浓度测定的操作条件，(2)可将血红蛋白浓度测定试剂作为血红蛋白 A1c 浓度测定用构成试剂共用，(3)可共用血红蛋白浓度测定用试样和血红蛋白 A1c 浓度测定用试样，(4)可使血红蛋白浓度测定的测定波长和血红蛋白 A1c 浓度测定的测定波长相同。

含有血红蛋白的试样中的底物的测定方法

技术领域

本发明涉及利用酶反应测定试样中的底物的方法，特别涉及可减弱试样中共存的血红蛋白对测定体系的干扰、以高精度测定试样中的底物的方法及其测定用试剂。

背景技术

随着对存在于血液、尿等生物体试样中的特定成分的量 and 疾病的关系的明确，在进行疾病的诊断、病症的确定、治疗效果的判断等时必须对该特定成分进行测定。目前，作为生物体试样(例如血清)中的特定成分的测定方法，一般有采用与作为目的物的特定成分或来自该特定成分的成分(以下总称为“底物”)进行特异性反应的酶进行酶反应，通过对生成物的测定进行定量的酶法。该酶法中，广泛普及的是使氧化酶这样的过氧化氢生成酶(以下有时称为“氧化酶”)与底物作用，用过氧化物酶及被氧化性显色试剂将生成的过氧化氢导入显色系统中，对该显色进行比色定量的方法。

作为前述利用氧化酶的底物的测定方法中的底物，例如可例举葡萄糖、胆固醇、中性脂肪、磷脂、游离脂肪酸、尿酸、肌酸内酰胺、唾液酸、多胺、糖化血红蛋白等，它们在临床检查的领域可被实际测定。

但是，由于该测定方法是以氧化酶的氧化反应为基础原理而确立的，所以存在易受到试样中共存的抗坏血酸、胆红素、血红蛋白等生物体内还原物质的干扰，测定值出现负误差的问题。此外，已知胆红素或血红蛋白本身在可见光区域具有吸收，所以会与比色定量时的测定波长重叠，导致误差，或者胆红素和血红蛋白本身的吸光会因来自外部的光或测定试剂中的成分而发生经时地变化，对测定结果产生影响。除此以外，已知还易受到脂质等造成的混浊的干扰。

上述物质中，血红蛋白混入生物体试样(血清、血浆、尿、唾液、脊髓液等)中的量通常是极微量的，但伴随溶血的疾病等情况除外，因采血等测定用

试样的采集条件、血液试样的调制、保存条件的不同有时血红蛋白会再次地漏到试样中。此外，以全血、血细胞或对它们进行处理而获得的溶血液为试样的情况下，自然而然地会混入血红蛋白。因此，利用氧化酶测定底物的方法中，减弱血红蛋白的干扰成为了重要的课题。

作为减弱使用氧化酶对试样中的底物进行定量时的血红蛋白的干扰的方法，已知的有在回避了血红蛋白本身的吸收波长的特定波长下进行测定的方法（例如，参照专利文献 1），以及使用阳离子系或两性表面活性剂的方法（例如，参照专利文献 2）。

但是，避开了血红蛋白本身的吸收波长、以特定的检测波长进行测定的方法中，不仅对比色定量时的检测波长有所限定，且对测定装置也有限制。此外，使用阳离子系或两性表面活性剂的方法中，与试样混合时会产生混浊，有时会对酶活性造成影响。

除此之外，已知组合使用 2 种阴离子型表面活性剂的方法（参照专利文献 3），但该方法中，为了避免阴离子型表面活性剂造成的酶蛋白的变性，必须同时使用特定量的烷基磺酸盐及烷基萘磺酸盐。

专利文献 1：日本专利特开平 9-119932 号公报

专利文献 2：日本专利特开平 3-10696 号公报

专利文献 3：日本专利特开平 8-89288 号公报

发明的揭示

本发明涉及利用酶反应测定试样中的底物的方法，即提供可减弱共存于试样的血红蛋白对测定体系的干扰、适用于各种自动分析装置的简便有效地测定试样中的底物的方法及其测定用试剂。

本发明者鉴于目前的情况，对利用酶反应测定试样中的底物的方法中的减弱共存于试样的血红蛋白对测定体系的干扰的方法进行认真研究后发现，通过用特定的阴离子型表面活性剂对试样进行处理能够减弱血红蛋白对测定体系的干扰，从而完成了本发明。

即，本发明提供含有血红蛋白的试样中的底物的测定方法，该方法是使对应于底物的氧化酶作用，用过氧化物酶及被氧化性显色试剂光学测定生成的过氧化氢，籍此测定试样中的底物，该方法的特征是，用选自聚氧乙烯烷基醚硫

酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂对含有血红蛋白的试样进行处理。

本发明还提供含有血红蛋白的试样中的底物的测定用试剂，该试剂包含(A)选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂，(B)作用于底物生成过氧化氢的氧化酶，以及(C)过氧化物酶及被氧化性显色试剂。

本发明还提供糖化蛋白质、糖化肽或糖化氨基酸的浓度或它们的浓度比的测定方法，该方法的特征在于，至少包含(1)表面活性剂，(2)对糖化蛋白质作用生成果糖基肽的蛋白酶，以及(3)对果糖基肽作用产生过氧化氢的酶。

本发明还提供血红蛋白浓度、血红蛋白 A1c 浓度及血红蛋白 A1c 浓度比的测定方法，该方法的特征是，对至少用表面活性剂进行了前处理的含有血红蛋白的试样中的血红蛋白进行测定，再使生成果糖基缬氨酰基组氨酸的蛋白酶作用于血红蛋白测定用反应液，进行血红蛋白 A1c 浓度测定。

本发明还提供血红蛋白浓度、血红蛋白 A1c 浓度及血红蛋白 A1c 浓度比的测定方法，该方法包括混合含血细胞的试样和含表面活性剂的反应液，使血红蛋白从血细胞溶出的步骤；稀释该反应液，利用光学方法求出血红蛋白浓度的步骤；使蛋白酶作用于血红蛋白，至少产生果糖基缬氨酰基组氨酸的步骤；至少以果糖基缬氨酰基组氨酸为底物，使产生过氧化氢的酶作用于该底物的步骤；使过氧化氢和过氧化物酶及被氧化性显色试剂作用的步骤；测定因显色化合物的生成而造成的吸光度变化，求出血红蛋白 A1c 浓度的步骤；以及由血红蛋白浓度和血红蛋白 A1c 浓度求出血红蛋白 A1c 浓度比的步骤。

本发明还提供血红蛋白浓度、血红蛋白 A1c 浓度及血红蛋白 A1c 浓度比的测定中的试样的前处理方法，该方法的特征是，使用选自聚氧乙烯衍生物、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸酯类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸类的非离子型表面活性剂及/或阴离子型表面活性剂。

本发明还提供血红蛋白浓度测定方法，该方法的特征是，在包括使血红蛋

白从血细胞溶出的步骤和求出血红蛋白浓度的步骤的血红蛋白的浓度测定中，至少使用选自聚氧乙烯衍生物、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸酯类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸类的非离子型表面活性剂及/或阴离子型表面活性剂。

本发明还提供采用生化学自动分析装置测定血红蛋白 A1c 浓度比的方法，该方法的特征是，以采用生化学自动分析装置测定血红蛋白 A1c 浓度比为目的，在设定生化学自动分析装置的操作条件时，(1)分别设定血红蛋白浓度测定和血红蛋白 A1c 浓度测定的操作条件，(2)可将血红蛋白浓度测定试剂作为血红蛋白 A1c 浓度测定用构成试剂共用，(3)可共用血红蛋白浓度测定用试样和血红蛋白 A1c 浓度测定用试样，(4)可使血红蛋白浓度测定的测定波长和血红蛋白 A1c 浓度测定的测定波长相同。

利用本发明的底物的测定方法，能够减弱试样中共存的血红蛋白的干扰，可以高精度测定底物。此外，本发明的底物的测定方法可以简便的操作进行测定，所以适用于各种分析方法，在临床检查的领域极其有用。

实施发明的最佳方式

本发明的底物的测定方法以减弱共存于试样中的血红蛋白的干扰为目的，除了用特定的阴离子型表面活性剂对试样进行处理之外，可按照公知的酶法实施。

作为本发明可适用的试样，只要是含血红蛋白的试样即可，无特别限定。作为生物体试样，可例举全血、血细胞、血清、血浆、脊髓液、汗液、尿液、泪液、唾液、皮肤、粘膜和毛发等。其中，较好的是全血、血细胞、血清或血浆。这些试样当然可直接供测定，也可以在经过过滤或透析处理后供测定，此外，还可根据需要进行试样(底物)的浓缩、萃取和稀释等。

前述稀释可用水或缓冲液进行。对这种情况下的缓冲液的种类、浓度无特别限定，可以 0.00001~2mol/L，较好是 0.001~1mol/L 的浓度使用磷酸、邻苯二甲酸、柠檬酸、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、马来酸、琥珀酸、草酸、酒石酸、乙酸、グロフ(MES、PIPES、ADA 等)缓冲液等。

可用于本发明的底物的测定方法的特定的阴离子型表面活性剂为选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚

磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂，较好的是聚氧乙烯烷基醚硫酸盐、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐、聚氧乙烯烷基醚磷酸类或烷基磺基琥珀酸类，特好的是聚氧乙烯烷基醚磷酸、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐或烷基磺基琥珀酸类，最好的是聚氧乙烯烷基醚磷酸。这些特定的阴离子型表面活性剂可作为市售品获得。

作为聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类，可例举ニッコール SBL-4N、ニッコール SBL-2T-36(以上由日本油脂株式会社制)，エマール 20T、エマール 327、エマール 20C(以上由花王株式会社制)，ハイテノール 225L、ハイテノール 325D、ハイテノール NF13、ハイテノール NF15(以上由第一工业制药株式会社制)，サンノール LMT-1430、サンノール DM1470(以上由狮王株式会社制)等。作为聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类，可例举ニッコール SNP-4N(日本油脂株式会社制)，エマール NC35(花王株式会社制)等。聚氧乙烯烷基醚磷酸类可以是磷酸单酯、磷酸二酯或其混合物，作为聚氧乙烯烷基醚磷酸类，可例举プライサーフ A208B、プライサーフ A219B、プライサーフ A208S、プライサーフ A212C、プライサーフ A212E、プライサーフ A215C(以上由第一工业制药株式会社制)等。这些聚氧乙烯烷基醚磷酸中，较好的是プライサーフ A208B。作为聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类，可例举ネオハイテノール S-70、ネオハイテノール L-30、ネオハイテノール LM-20(以上由第一工业制药株式会社制)等。作为聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类，可例举カオーアキボ RLM-100NV(花王株式会社制)，ネオハイテノール ECL-30(第一工业制药株式会社制)，エヌジューブ 2PS30、エヌジューブ 2PS45(以上由新日本理化株式会社制)等。作为聚氧乙烯烷基醚磺酸类，可例举リオノール OAI-N、リオノール OBI(以上由狮王株式会社制)等。

作为月桂基硫酸三乙醇胺，可例举エマール TD(花王株式会社制)。作为烷基磺基琥珀酸类，可例举ペレックス CS(花王株式会社制)。作为烷基苯基醚磺酸盐类，可例举ペレックス SS-H(花王株式会社制)。

含有血红蛋白的试样的处理可通过混合该特定的阴离子型表面活性剂和试样来进行。特定的阴离子型表面活性剂的用量以与前述全血、血细胞、血清等试样混合后的浓度计为 0.0001~10%，较好为 0.001~3%。对含有血红蛋白的试样的处理时间和处理温度无特别限定，例如，用于自动分析装置时，较好的是处理时间 5 分钟，处理温度 37℃等。另外也可以在用于自动分析装置前进行其它处理。这些处理条件都可通过实验适当选择。只要利用特定的阴离子

型表面活性剂对试样进行处理时的 pH 和添加物等对利用酶反应测定底物时无不良影响，同样对它们没有特别限定。

可利用本发明的底物的测定方法测定的底物只要是可通过使用氧化酶的酶法进行测定的底物即可，无特别限定。因此，本发明的底物包括其本身是可成为氧化酶的底物的物质的情况，以及通过酶反应或某些处理获得的生成物可成为氧化酶的底物的情况(相当于来自前述特定成分的成分)。这些底物可例示葡萄糖、甘露糖、半乳糖等糖类，胆甾醇、中性脂肪、磷脂、游离脂肪酸等脂质类，糖化白蛋白、糖化血红蛋白等糖化蛋白质类，尿酸、尿素、肌酸内酰胺、唾液酸、多胺等。

其中，葡萄糖、尿酸等属于其本身是可成为氧化酶的底物的物质的情况，用水解酶对血清中的酯型胆甾醇进行处理而得的胆甾醇或用蛋白酶对血清中的糖化蛋白质进行处理而得的糖化肽及糖化氨基酸等属于通过酶反应或某些处理而获得的生成物可成为氧化酶的底物的情况。

通过酶反应或某些处理而获得的生成物可成为氧化酶的底物的情况中，进一步举例说明用蛋白酶对糖化蛋白质进行处理，获得成为氧化酶的底物的糖化肽及糖化氨基酸的情况。

这种情况下的蛋白酶只要具备蛋白分解活性和肽分解活性即可，可来源于微生物、动物、植物等各种途径，对其无特别限定。使用可在短时间内有效地从作为目的物的糖化蛋白质(例如，血红蛋白 A1c)游离糖化肽或糖化氨基酸，较好为果糖基肽或果糖基氨基酸，特好为果糖基缬氨酰基组氨酸或果糖基缬氨酸的蛋白酶。具体来讲可例举蛋白酶 K、胰蛋白酶、菠萝蛋白酶、羧肽酶、木瓜酶、胃蛋白酶、氨肽酶等作为研究用试剂被广泛销售的蛋白酶；中性蛋白酶、トヨチーム NEP(以上由东洋纺株式会社制)，酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、耐酸性蛋白酶、AO 蛋白酶、肽酶(以上由キョーマン株式会社制)，スミチーム CP、スミチーム TP、スミチーム LP50D(以上由新日本化学工业株式会社制)，サモアーゼ PC10F、プロチン PC、プロチン PC10F、プロチン PS10、プロチン NY10、プロチン NL10、プロチン NC25(以上由大和化成株式会社制)，アクチナーゼ AS(科研制药株式会社制)，プロナーゼ E(ロッシュ株式会社制)，ウマミザイム、蛋白酶 S “アマノ” G、蛋白酶 A “アマノ” G、蛋白酶 P “アマノ” 3G(以上由アマノ酶株式会社制)等市售的工业用酶。使这些蛋白酶与作为目的物的糖化蛋白质、果糖基肽作用，利用毛细电泳对作用前后的试样进行分析，通过比较

可确认效果。上述蛋白酶可单独使用，也可2种以上组合使用。其中，较好的是来自杆菌属、曲霉属或链霉菌属的微生物或由其基因产生的酶，或属于金属蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶或碱性蛋白酶的酶。

蛋白酶的浓度只要是能够将目的底物有效地游离的浓度即可，无特别限定。可考虑所用酶的活性率等，根据实际的经验适当设定使用浓度。用蛋白酶进行处理时的pH无需特别的调整，但为了形成适应于所用酶的作用的pH，可利用适当的pH调节剂，例如利用缓冲液将品pH调整为3~11。处理温度较好为10~40℃。

可在本发明的底物的测定方法中使用的氧化酶是具备氧化需测定的底物生成过氧化氢的能力的酶，可使用公知的氧化酶。例如可例举葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶、尿酸酶、胆甾醇氧化酶、果糖基氨基酸氧化酶(日本专利特开2003-79386号公报及国际公开第97/20039号小册子)、酮胺氧化酶(日本专利特开平5-19219号公报)、果糖基肽氧化酶(日本专利特开2001-95598号公报及特开2003-235585号公报)等。这些酶可以来源于微生物、动物、植物等各种途径，也可以是通过基因方法获得的酶。另外，也不介意是否进行了化学修饰。这些酶可以是溶液状态也可以是干燥状态，可保持或结合于不溶性载体，可以单独使用也可以2种以上组合使用。

这些酶的用量根据酶的种类的不同而不同，可考虑所用酶的活性率，根据实际的经验适当设定使用浓度，无特别限定。较好的是0.001~1000单位/mL，特好为0.01~1000单位/mL。考虑所用酶的最适pH，采用缓冲液调整使其作用时的pH值。使其发挥作用时的温度例如为10~40℃，可适当选择被用于通常的酶反应的温度。

上述氧化酶可根据需要与其它酶、辅酶、被氧化性显色试剂等组合使用。其它的酶可例举过氧化物酶、心肌黄酶或不以果糖基缬氨酸为底物的氨基酸代谢酶等。此外，以对血红蛋白以外的生物体内的干扰物质进行处理为目的，也可使用抗坏血酸氧化酶、胆红素氧化酶等酶。作为辅酶，可例举烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型(NADH)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型磷酸(NADPH)、硫代NAD、硫代NADP等。

作为被氧化性显色试剂，只要是与过氧化氢反应进行显色的试剂即可。例如可例举4-氨基安替比林和酚系、纳夫妥系或苯胺系化合物的组合，3-甲基

—2—苯并噻唑啉酮脲和苯胺系化合物的组合等。作为可与4-氨基安替比林组合的酚系化合物,可例举苯酚、对氯苯酚、2,4-二氯苯酚、2,4-二溴苯酚、2,4,6-三氯苯酚等,作为苯胺系化合物,可例举N,N-二甲基苯胺、N,N-二乙基苯胺、N,N-二甲基-间甲苯胺、N,N-二乙基-间甲苯胺、N-乙基-N-磺基丙基-间甲苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-间甲苯胺(TOOS)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙酰基乙二胺、3-甲基-N-乙基-N-(羟基乙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)苯胺(ALOS)、N-乙基-N-(3-磺基丙基)苯胺(ALPS)、N,N-二甲基-间茴香胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-间茴香胺(ADOS)等。另外,可例举N-(羧基甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲基氨基)-二苯基胺·钠盐(DA-64)、10-(羧基甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)-吩噻嗪·钠盐(DA-67)、10-N-甲基氨基甲酰基-3,7-二甲基氨基-10H-吩噻嗪(MCDP)、N,N,N',N',N'',N''-六-3-磺基丙基-4,4',4''-三氨基三苯基甲烷(TPM-PS)、二氨基联苯胺、羟基苯基丙酸、四甲基联苯胺、邻苯二胺等。

本发明的底物的测定方法可以用前述阴离子型表面活性剂对试样进行处理、减弱试样中的血红蛋白的干扰的步骤和使氧化酶作用、测定生成的过氧化氢的步骤分别进行来测定底物,也可以是上述步骤连续地以一步进行来测定底物,反应温度在上述2个步骤中可以相同也可以不同,本发明的底物测定用试剂为溶液状态的温度例如较好为10~40℃。

本发明的底物的测定方法可减弱通过氧化酶反应测定底物时的血红蛋白的干扰,另一方面,如果在用本发明涉及的阴离子型表面活性剂对试样进行了处理的阶段测定血红蛋白所具有的吸收波长区域内的吸光度,则可测定试样中的血红蛋白。由于籍此能够测定糖化血红蛋白(较好为血红蛋白A1c),所以对利用本发明的底物的测定方法测定血红蛋白A1c的情况进行说明。

血红蛋白A1c是由包含在红细胞中的血红蛋白非酶糖化而形成的,由于反映过去一定时间内的平均血糖值,所以被视为重要的临床检查指标。由于血红蛋白A1c以对应于总血红蛋白存在量的比例(%)表示,所以其测定必须包括(i)使红细胞溶血,使血红蛋白释放至红细胞外,形成可进行测定的状态的步骤;(ii)测定血红蛋白的存在量的步骤;(iii)测定血红蛋白A1c的存在量的步骤(采用酶法时,包括利用蛋白酶使特异性糖化肽或糖化氨基酸从血红蛋白A1c游离的步骤,以及使用特异性氧化酶测定该游离的糖化肽或糖化氨基酸的步骤);(iv)用血红蛋白A1c存在量除以总血红蛋白存在量求出比例的步骤(演算

步骤)。如前所述，本说明书中的“底物的测定”一词除了是指试样中的底物的存在量(例如浓度)的测定之外，还包括特定的底物物质中所占的存在比例(例如浓度比)的测定。

本发明涉及的阴离子型表面活性剂由于具有血红蛋白的高铁(メト)化处理能力，所以可测定血红蛋白的吸收波长区域的吸光度，毫无问题地实施(ii)的步骤。

(i)的步骤中可使用以往公知的各种表面活性剂(例如，非离子型表面活性剂 Triton X-100 等)，本发明涉及的阴离子型表面活性剂，特别是选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸酯类或月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类、烷基苯基醚磺酸类的阴离子型表面活性剂可用于(i)的步骤，可单独使用也可与以往公知的各种表面活性剂并用。此外，(i)的步骤中，作为可单独或与本发明的阴离子型表面活性剂并用的非离子型表面活性剂，除了以往公知的表面活性剂之外，可使用作为聚氧乙烯衍生物のエマルゲン类(花王株式会社制，エマルゲン 709、エマルゲン 108、エマルゲン A90、エマルゲン B66 等)，ニコール类(ニコークミカルズ株式会社制，ニコール BC20TX、ニコール OP-10、ニコール BT9 等)，リポノックス类(狮王株式会社制，リポノックス NC80、リポノックス OC100 等)，レオコール类(狮王株式会社制，レオコール TD90、レオコール SC120 等)，ノイゲン类(第一工业制药株式会社制，ノイゲン EA120、ノイゲン ET147 等)，エパン类(第一工业制药株式会社制，エパン 485、エパン U103 等)，プルロニク类(旭电化株式会社制，プルロニク F、プルロニク TR704 等)，アデカトール类(旭电化株式会社制，アデカトール S0120 等)。

(iii)的步骤是利用蛋白酶使来自血红蛋白 Alc 的糖化肽或糖化氨基酸从血红蛋白 Alc 游离，再使用果糖基肽氧化酶或果糖基氨基酸氧化酶来实施的。(iii)的步骤如前所述，进一步详细地对其说明。血红蛋白 Alc 的测定中，血红蛋白 β -亚单位的氨基末端的缬氨酸被糖化而得的果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰基组氨酸和 ϵ -果糖基赖氨酸对氧化酶的反应性的不同决定了特异性，但血红蛋白分子中存在 44 个赖氨酸残基，即使对 ϵ -果糖基赖氨酸的反应性较低，其影响力也不能够忽视。另外，血红蛋白的 α 链 N 末端的缬氨酸通过糖化可转变为果糖基缬氨酸，但由于与缬氨酸相邻结合的氨基酸不是组氨酸，所以未生成果糖基缬氨酰基组氨酸。因此，为确保利用酶法的血红蛋白 Alc 测定的

特异性，当然需要尽可能排除将果糖基赖氨酸也测定在内的情况，测定果糖基缬氨酰基组氨酰基肽比仅测定果糖基缬氨酸要更理想。因此，从特异性提高的观点考虑，最理想的是通过用蛋白酶使果糖基缬氨酰基组氨酰基肽、较好是果糖基缬氨酰基组氨酸游离，以及使果糖基肽氧化酶作用于果糖基缬氨酰基组氨酸。

作为上述蛋白酶，较好的是来自杆菌属、曲霉属或链霉菌属的微生物或由其基因重组产生的酶。来自杆菌属的酶可例举プロチン PC10F、プロチン NC25(大和化成株式会社制)，トヨチーム NEP(东洋纺株式会社制)等；来自曲霉属的酶可例举耐酸性蛋白酶(キョーマン株式会社制)；来自链霉菌属的酶可例举アクチナーゼ AS、アクチナーゼ AF、アクチナーゼ E(科研制药)，蛋白酶 Type- XIV(Siga 公司制)等。它们可单独使用，也可将トヨチーム NEP 等和蛋白酶 K 混合并用。这些酶较好为属于金属蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶或碱性蛋白酶的酶。使用浓度或使用条件如前所述。

作为上述果糖基肽氧化酶，可例举改变了由棒状杆菌属的菌产生的果糖基氨基酸氧化酶的酶(日本专利特开 2001-95598 号公报)、来自丝状菌的果糖基肽氧化酶(日本专利特开 2003-235585 号公报)等。特好的是 FPOX-CE 或 FPOX-EE(都由キョーマン株式会社制)。

可依次实施(i)的步骤至(iv)的步骤，也可同时实施多个步骤。例如，如果用同时包含 Triton X-100 等以溶血为目的的表面活性剂和プライサーフ A208B 等本发明的阴离子型表面活性剂的试剂对全血或血细胞进行处理，则可同时实施(i)、(ii)的步骤，如果再有蛋白酶 K 或アクチナーゼ AS 等蛋白酶共存，还可同时实施(iii)的步骤的一部分。

此外，利用本发明的血红蛋白 Alc 的测定方法，采用日立 7150 型自动分析装置等临床检查(特别是生化学检查)领域常用的自动分析装置(以下有时称为“生化学自动分析装置”)，测定血红蛋白 Alc 浓度比(%) (以下有时称为“血红蛋白 Alc(%)”)的情况下，设定生化学自动分析装置的操作条件时，(1)分别设定血红蛋白浓度测定和血红蛋白 Alc 浓度测定的操作条件，(2)可将血红蛋白浓度测定试剂作为血红蛋白 Alc 浓度测定用构成试剂共用，(3)可共用血红蛋白浓度测定用试样和血红蛋白 Alc 浓度测定用试样，(4)可使血红蛋白浓度测定的测定波长和血红蛋白 Alc 浓度测定的测定波长相同。本发明还提供以该(1)~(4)项为特征的采用生化学自动分析装置测定血红蛋白 Alc 值(%)的方法。

本发明的试剂在测定血红蛋白 A1c 浓度比时，不论是使用 1 个反应容器测定血红蛋白浓度和血红蛋白 A1c 浓度，或者是用生化学自动分析装置进行测定时，都可以是采用连续添加构成试剂的所谓的单通道法，但设定生化学自动分析装置的操作条件时，最好分别设定血红蛋白浓度测定和血红蛋白 A1c 浓度测定的试剂用量等操作条件。本发明的试剂中可将血红蛋白浓度测定用试剂共用作血红蛋白 A1c 浓度测定用构成试剂，试样也可以共用。测定条件中，可使血红蛋白浓度测定的测定波长和血红蛋白 A1c 浓度测定的测定波长相同。

本发明的底物测定用试剂包含 (A) 选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基醚羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂，(B) 作用于底物或作用于通过酶反应产生的底物生成过氧化氢的氧化酶，以及 (C) 过氧化物酶及被氧化性显色试剂。

此外，也可以由使前述 (B) 记载的氧化酶作用获得的生成物再产生过氧化氢来提高灵敏度。例如，可使由血红蛋白 A1c 游离的糖化肽或糖化氨基酸和果糖基肽氧化酶或果糖基氨基酸氧化酶作用时生成的葡糖酮醛中含有糖氧化分解酶(日本专利特开 2000-333696 号公报)。作为这种情况下的糖氧化分解酶，较好的是选自葡糖氧化酶、 β -半乳糖氧化酶、吡喃糖氧化酶的至少 1 种氧化酶。另外，如前所述，可使用将血红蛋白从红细胞提取供于反应的前处理剂。此外，还可添加对血液中的夹杂成分进行处理的酶，氯化钠、氯化钾、亚铁氰化钠等盐，反应调节剂，用于消除还原性物质的影响的四唑鎓盐，作为防腐剂的抗生素和叠氮化钠等。

本发明的底物测定用试剂不仅可以溶液状态提供，也可以干燥状态或凝胶状态提供。此外，能够以将其填充于玻璃瓶、塑料容器等中，或者将其涂布、含浸于不溶性载体等的形态提供。作为不溶性载体，可例举胶乳、玻璃、胶体等粒子·球状载体，半导体或玻璃等平板状载体，纸或硝基纤维素等膜状载体，纤维状载体。

实施例

以下，例举实施例对本发明进行更详细地说明，但本发明并不仅限于此。

[实施例 1~6] 尿酸的测定

(1) 试样的调制

在 9 体积的血清中加入 1 体积的生理食盐水或人血红蛋白溶液，调制血红蛋白浓度分别为 0、100、300 及 500mg/dL 的含有血红蛋白的试样。

(2) 试样的测定

采用日本 7150 型自动分析装置，通过以下操作测定各试样。

(第一试剂)

阴离子型表面活性剂

实施例 1: 0.5% エマール 20C (花王株式会社制)

实施例 2: 0.5% ハイテノール NF13 (第一工业制药株式会社制)

实施例 3: 0.05% ハイテノール NF15 (第一工业制药株式会社制)

实施例 4: 0.5% プライサーフ A208B (第一工业制药株式会社制)

实施例 5: 0.05% ベレックス CS (花王株式会社制)

实施例 6: 0.1% ベレックス SS-H (花王株式会社制)

比较例 1: 不含阴离子型表面活性剂

比较例 2: 0.05% ラテムル PS+0.05% ベレックス NBL

比较例 3: 0.1% ラテムル PS+0.1% ベレックス NBL

500 μ mol/L T00S (同仁化学株式会社制)

50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)

将在组合阴离子型表面活性剂、避免血红蛋白的干扰的以往公知(日本专利特开平 8-89288 号公报)的方法中记载的烷基磺酸钠盐(商品名 ラテムル PS: 花王株式会社制)及烷基萘磺酸钠盐(商品名 ベレックス NB-L: 花王株式会社制)的组合作为比较例 2 和 3。

(第二试剂)

2 单位/mL 尿酸酶(东洋纺株式会社制)

10 单位/mL 过氧化物酶(III)(东洋纺株式会社制)

1mmol/L 4-氨基安替比林

50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)

在 7 μ L 各试样中加入第一试剂 260 μ L，测定于 37°C 加温 5 分钟后的吸光度(吸光度 I)。然后，加入第二试剂 130 μ L，测定于 37°C 加温 5 分钟后的吸光度(吸光度 II)。吸光度的测定在主波长 546nm(副波长 800nm)下进行，用生理食盐水替代试样进行同样地操作(试剂空白)作为对照。由各试样的吸光度 I 及

吸光度 II，用式 A 算出各试样的吸光度变化量，将浓度已知的尿酸溶液 (20mg/dL) 作为试样，与上述同样操作，将其吸光度变化量与上述吸光度变化量进行比较，算出尿酸浓度。

式 A: 试样的吸光度 = 吸光度 II - (吸光度 I × (7+260) / (7+260+130))

对于所得尿酸的测定值，以血红蛋白浓度为 0mg/dL 时的测定值作为 100% 进行比较，结果示于表 1。

表 1

	阴离子型 表面活性剂	血红蛋白浓度(mg/dL)			
		0	100	300	500
比较例 1	无添加	100.0	92.1	74.8	77.2
比较例 2	0.05% ラテムル PS+0.05% ベレックス NBL	100.0	83.6	62.1	54.3
比较例 3	0.1% ラテムル PS+0.1% ベ レックス NBL	100.0	82.4	72.6	74.0
实施例 1	0.5% エマール 20C	100.0	95.0	89.0	85.3
实施例 2	0.5% ハイテノール NF13	100.0	93.9	87.9	84.6
实施例 3	0.05% ハイテノール NF15	100.0	89.8	86.6	83.6
实施例 4	0.5% プライサーフ A208B	100.0	95.5	94.4	86.4
实施例 5	0.05% ベレックス CS	100.0	92.9	88.9	88.8
实施例 6	0.1% ベレックス SS-H	100.0	97.2	80.5	78.7
		(%)	(%)	(%)	(%)

从表 1 可明显看出，以往公知的阴离子型表面活性剂的组合 (比较例 2 和 3) 与未添加表面活性剂的比较例 1 相比，血红蛋白的干扰反而增加。对应于此，使用了本发明的阴离子型表面活性剂的情况 (实施例 1~6) 中的任一项与未添加表面活性剂的比较例 1 相比，血红蛋白的干扰得到减弱。因此，可以认为本发明的底物的测定方法在用以以往公知的方法无效的情况下也是有效的。

[实施例 7] 果糖基氨基酸的测定

(1) 试样的调制

使用为使 542nm 下的吸光度达到 5 OD 而调制的血红蛋白—生理食盐水稀释液，调制果糖基缬氨酸 (fV) 浓度为 5 μmol/L、10 μmol/L 的含有血红蛋白的试样。作为对照，用生理食盐水替代血红蛋白—生理食盐水稀释液。fV 使用バイオクエスト株式会社的产品。

(2) 试样的测定

采用日本 7150 型自动分析装置，通过以下操作测定各试样。

(第一试剂)

阴离子型表面活性剂

实施例 7: 0.2% プライサーフ A208B (第一工业制药株式会社制)

比较例 4: 不含阴离子型表面活性剂

20mmol/L 磷酸缓冲液 (pH8.0)

(第二试剂)

15 单位/mL 果糖基氨基酸氧化酶 (キ, コー マ ン 株式会社制)

20 单位/mL 过氧化物酶 (III) (东洋纺株式会社制)

80 μ mol/L TPM-PS (同仁化学株式会社制)

200mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)

在 20 μ L 各试样中加入第一试剂 240 μ L, 测定于 37°C 加温 5 分钟后的吸光度 (吸光度 I)。然后, 加入第二试剂 80 μ L, 测定于 37°C 加温 5 分钟后的吸光度 (吸光度 II)。吸光度的测定及试样的吸光度变化量的计算按照实施例 1~6 的方法进行。结果示于表 2。

表 2

fV 浓度		a	b	b/a
5	实施例 7	71	67	94
	比较例 4	60	51	85
10	实施例 7	118	110	93
	比较例 4	103	85	83

(μ mol/L)

(mOD/mL)

(mOD/mL)

(%)

a: 对照组的吸光度变化量, b: 含有血红蛋白的试样的吸光度变化量

从表 2 可明显看出, 使用了本发明的阴离子型表面活性剂的情况下, 血红蛋白的干扰被减弱。

[实施例 8] 果糖基氨基酸的测定

(1) 试样的调制

与实施例 7 同样调制含有血红蛋白的试样及对照试样。

(2) 试样的测定

使用日立 7150 型自动分析装置, 除了所用第二试剂如下所示之外, 其它操作步骤与实施例 7 同样, 对各试样进行测定。

(第二试剂)

4 单位/mL 果糖基肽氧化酶 (キ, コー マ ン 株式会社制)

20 单位/mL 过氧化物酶(III) (东洋纺株式会社制)

80 μ mol/L TPM-PS (同仁化学株式会社制)

200mmol/L 磷酸缓冲液 (pH5.5)

表 3

fV 浓度		a	b	b/a
5	实施例 8	44	43	98
	比较例 5	43	26	60
10	实施例 8	84	78	93
	比较例 5	83	50	60

(μ mol/L)

(mOD/mL)

(mOD/mL)

(%)

a: 对照组的吸光度变化量, b: 含有血红蛋白的试样的吸光度变化量

从表 3 可明显看出, 使用了本发明的阴离子型表面活性剂的情况下, 血红蛋白的干扰被减弱。

[实施例 9~13] 血红蛋白 A1c 的测定

(1) 试样的调制

采用含有 EDTA 作为抗凝剂的采血管, 按照常规方法从 10 个被检者采集全血, 将该全血在冷藏室内静置一晚, 使红细胞沉降。从沉降的各红细胞层中分别提取 10 μ L, 在其中添加混合 0.1% 的 Triton X-100 水溶液, 调制出血细胞溶血试样。

(2) 试样的测定

采用日立 7150 型自动分析装置, 通过以下操作测定各试样。

(第一试剂)

阴离子型表面活性剂

实施例 9: 0.5% プライサーフ A212E (第一工业制药株式会社制)

实施例 10: 0.5% プライサーフ A215C (第一工业制药株式会社制)

实施例 11: 0.2% プライサーフ A208B (第一工业制药株式会社制)

实施例 12: 0.5% ニュール SBL-4N (日本油脂株式会社制)

实施例 13: 3.0% エマール NC35 (花王株式会社制)

比较例 6: 不含阴离子型表面活性剂

1 单位/mL 蛋白酶 K

0.02mol/L 磷酸缓冲液 (pH8.0)

(第二试剂)

4 单位/mL 果糖基肽氧化酶 (FPOX-CE, キョーマン株式会社制)

20 单位/mL 过氧化物酶 (III) (东洋纺株式会社制)

80 μ mol/L TPM-PS (同仁化学株式会社制)

7500 单位/mL トヨチーム NEP (东洋纺株式会社制)*

37.5 mmol/L NaCl

0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH5.5)

*于 4°C, 10 万单位/mL 的浓稠液对含 500 mmol/L 的 NaCl 的 20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH5.5) 进行 4 小时的透析后使用 トヨチーム NEP。

在 20 μ L 各试样中加入第一试剂 240 μ L, 测定于 37°C 加温 5 分钟后的吸光度 (吸光度 III)。然后, 加入第二试剂 80 μ L, 测定于 37°C 加温 5 分钟后的吸光度 (吸光度 IV)。吸光度的测定在波长 600 nm 下进行, 用生理食盐水替代试样进行同样的操作 (试剂空白) 作为对照。

由各试样的吸光度 III 及吸光度 IV, 用式 B 算出各试样中的基于果糖基肽量的吸光度变化量 (吸光度 V)。

式 B: 吸光度 V = 吸光度 IV - (吸光度 III \times (20 + 240) / (20 + 240 + 80))

由于与试样中的总血红蛋白浓度成比例, 所以将上述吸光度 III 与对血红蛋白 A1c 值 (%) 已知的血细胞溶血液 (血红蛋白 A1c 值 8.6%) 进行和上述同样的操作时的吸光度 III 及吸光度 V 进行比较, 算出各试样的血红蛋白 A1c 值 (%)。

分别将通过实施例 9~13 及比较例 6 求出的血红蛋白 A1c 值 (%) 与利用市售的试剂盒 “ラピディア A1c” (富士レビオ株式会社制) 测定的各试样的血红蛋白 A1c 值 (%) (参考例) 进行比较。结果示于表 4。

表 4

试样 No.	实施例 9	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13	比较例 6	参考例
1	5.0	4.8	4.7	5.6	5.2	-165.6	5.6
2	3.9	4.4	5.0	3.8	4.3	-77.8	4.9
3	3.5	3.6	3.0	3.8	3.3	-94.8	4.6
4	5.2	5.5	5.7	4.6	5.1	-8.0	6
5	6.4	7.0	7.8	6.3	6.7	19.3	6.8
6	7.3	7.9	7.4	8.5	9.9	-10.7	7.9
7	7.9	8.3	8.2	9.1	9.6	-15.4	8.4
8	8.5	8.9	8.9	9.4	10.1	25.2	8.8
9	9.1	9.7	9.9	10.5	10.5	-1.0	9.6
10	10.8	11.1	12.3	12.0	11.7	30.0	11.5
相关系数	0.99	0.99	0.97	0.98	0.96	0.71	

除相关系数以外的值为(%)

从表 4 可明显看出，不含本发明的阴离子型表面活性剂的比较例 6 有时出乎意料地出现了负值，完全无法进行血红蛋白 Alc 值(%)的测定。对应于此，利用本发明的底物的测定方法获得的血红蛋白 Alc 值(%)与参考例的结果显示出良好的相关性。利用本发明的底物的测定方法，能够避免含有血红蛋白的试样中的血红蛋白的干扰，测定试样中的血红蛋白 Alc 和总血红蛋白。

专利名称(译)	含有血红蛋白的试样中的底物的测定方法		
公开(公告)号	CN1882696A	公开(公告)日	2006-12-20
申请号	CN200480033978.2	申请日	2004-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社		
[标]发明人	谷口由利子 斋藤和典		
发明人	谷口由利子 斋藤和典		
IPC分类号	C12Q1/26 C12Q1/37 G01N33/72 C12Q1/28 G01N33/53 G01N33/62 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6812 G01N33/723 G01N33/725 C12Q1/26 C12Q1/28 G01N33/721 G01N33/6842		
优先权	2003389930 2003-11-19 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供可减弱试样中的血红蛋白的干扰、适用于各种自动分析装置的简便且有效的测定试样中的底物的方法及其测定用试剂。含有血红蛋白的试样中的底物的测定方法是通过使对应于底物的氧化酶作用，用过氧化物酶及被氧化性显色试剂光学测定生成的过氧化氢来测定试样中的底物的方法，该方法的特征在于，用选自聚氧乙烯烷基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磷酸类、聚氧乙烯烷基磺基琥珀酸类、聚氧乙烯烷基羧酸盐类、聚氧乙烯烷基醚磺酸盐类、月桂基硫酸三乙醇胺、烷基磺基琥珀酸类及烷基苯基醚磺酸盐类的阴离子型表面活性剂对含有血红蛋白的试样进行处理。

表 1

	阴离子型 表面活性剂	血红蛋白浓度(mg/dL)			
		0	100	300	500
比较例 1	无添加	100.0	92.1	74.8	77.2
比较例 2	0.05% ラテムル PS+0.05% ベレックス NBL	100.0	83.6	62.1	54.3
比较例 3	0.1% ラテムル PS+0.1% ベ レックス NBL	100.0	82.4	72.6	74.0
实施例 1	0.5% エマール 20C	100.0	95.0	89.0	85.3
实施例 2	0.5% ハイテノール NF13	100.0	93.9	87.9	84.6
实施例 3	0.05% ハイテノール NF15	100.0	89.8	86.6	83.6
实施例 4	0.5% プライサーフ A208B	100.0	95.5	94.4	86.4
实施例 5	0.05% ベレックス CS	100.0	92.9	88.9	88.8
实施例 6	0.1% ベレックス SS-H	100.0	97.2	80.5	78.7
		(%)	(%)	(%)	(%)