



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104395729 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201380033722. 0

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2013. 04. 25

代理人 李慧惠 梁谋

(30) 优先权数据

12002952. 5 2012. 04. 26 EP

12196036. 3 2012. 12. 07 EP

12198881. 0 2012. 12. 21 EP

(51) Int. Cl.

G01N 21/25(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/27(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/058674 2013. 04. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/160424 EN 2013. 10. 31

(71) 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 G. 库尔茨 E. 洛佩斯-卡勒

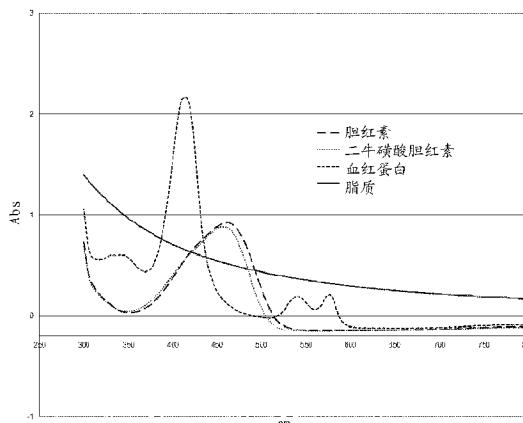
权利要求书2页 说明书27页 附图3页

(54) 发明名称

用于在自动分析仪上光度测定流体样品中的分析物的多应用方法

(57) 摘要

本发明涉及用于通过光度测定法测定可以显示干扰的样品的特定分析物的量的方法,其中所述特定分析物从所述分析物与分析物特异性测定试剂相互作用后反应混合物的光信号变化来定量。对于待测定的样品的特定分析物,对于多个波长生成多条校准曲线,将测量结果储存在仪器平台的数据管理系统中。同时进行干扰测试以测定特定分析物,用于定量待测定样品中存在的干扰物质的量。将各干扰物质的量与预定截止值进行比较。在完整反应时间在多个波长测量反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号,且根据干扰物质选择校准曲线。最终,通过与所选波长的所选校准曲线比较来定量待测定的样品的特定分析物的量。



1. 用于通过光度测定法测定可以显示干扰的样品的特定分析物的量的方法,其中所述特定分析物从所述分析物与分析物特异性测定试剂相互作用后反应混合物的光信号中的变化来定量,所述方法包括以下步骤:

a) 对于待测定样品的特定分析物,对于多个波长生成多条校准曲线,且将测量结果储存在仪器平台的数据管理系统中,

b) 同时进行干扰测试以测定特定分析物,用于定量待测定样品中存在的干扰物质的量,且将每种干扰物质的量与预定截止值进行比较,

c) 在多个波长测量所述反应混合物中待测定样品的特定分析物的光信号,

d) 根据所述干扰物质选择步骤 a 的相应校准曲线,和

e) 通过与所选波长的所选校准曲线的比较来定量待测定样品的特定分析物的量。

2. 根据前述权利要求的方法,其中将包含反应时间、校准点、校准模式和测定类型的特定测量条件额外应用于测量方案。

3. 根据前述权利要求的方法,其中显示干扰的样品可以在相应的仪器平台上使用可商购的分光光度实验室测试来定量,而无需应用预分析样品处理和 / 或改变测定试剂和程序。

4. 根据前述权利要求之一的方法,其中在波长 1 记录的校准曲线 1 用于未显示干扰的样品。

5. 根据前述权利要求之一的方法,其中使用在波长 2 记录的校准曲线 2,其经优化用于显示溶血干扰的样品。

6. 根据前述权利要求之一的方法,其中使用在波长 3 记录的校准曲线 3,其经优化用于显示黄疸干扰的样品。

7. 根据前述权利要求之一的方法,其中使用在波长 4 记录的校准曲线 4,其经优化用于显示脂血干扰的样品。

8. 根据前述权利要求之一的方法,其中使用在波长 5 记录的校准曲线 5,其经优化用于显示溶血和黄疸或脂血干扰的样品。

9. 根据前述权利要求之一的方法,其中使用在波长 6 记录的校准曲线 6,其经优化用于在低分析物浓度显示溶血干扰的样品。

10. 根据前述权利要求之一的方法,其中使用在波长 7 记录的校准曲线 7,其经优化用于在高分析物浓度显示溶血干扰的样品。

11. 根据前述权利要求之一的方法,其中可以在测量范围定义多于 2 条校准曲线,各自经优化以降低某一浓度范围的样品的干扰。

12. 用于降低显示溶血和 / 或黄疸和 / 或脂血和 / 或其他干扰的样品的基于分光光度的实验室测试的干扰的方法,其中将包含测量波长、反应时间、校准点、校准模式的特定测量条件额外应用于测量方案,而无需应用预分析样品处理和 / 或改变测定方法。

13. 额外应用于测量方案的特定测量条件用于降低测定可以显示溶血和 / 或黄疸和 / 或脂血干扰的样品中特定分析物的量的基于分光光度的实验室测试的干扰的用途,所述特定测量条件包含测量波长、反应时间、校准点、和校准模式。

14. 仪器平台,其使用用于测定可以显示溶血和 / 或黄疸和 / 或脂血干扰的样品中特定分析物的量的可商购的分光光度实验室测试,其中所述仪器平台的数据管理系统能够处理

反应时间、校准点、校准模式、波长、血清指标的数据,用于选择最佳拟合校准曲线。

15. 根据前述权利要求的方法,其中进行包含测量波长、反应时间、校准模式、校准点数量的测量结果的额外校正,且针对彼此进行抵消。

用于在自动分析仪上光度测定流体样品中的分析物的多应用方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于通过光度测定法测定可以显示干扰的样品的特定分析物的量的方法,其中所述特定分析物从所述分析物与分析物特异性测定试剂相互作用后反应混合物的光信号变化来定量。对于待测定样品的特定分析物,对于多个波长生成多条校准曲线,将测量结果储存在仪器平台的数据管理系统中。同时进行干扰测试以测定特定分析物,用于定量待测定样品中存在的干扰物质的量。将各干扰物质的量与预定截止值进行比较。在完整反应时间在多个波长测量反应混合物中待测定样品的特定分析物的光信号,且根据干扰物质选择校准曲线。最终,通过与所选波长的所选校准曲线比较来定量待测定样品的特定分析物的量。

[0002] 用于光度测定流体中的分析物的诊断测定法,包括浊度 (turbidimetric)、比浊 (nephelometric) 和比色 (colorimetric) 测定法,是常见且众所周知的。由于其容易的一步程序和其短周转时间,此类测定法是用于在自动分析仪中应用的理想候选。如今,高度自动化的分光光度分析仪用于临床诊断中以便以时间和成本有效的方式进行光度测定法。分析仪上的工作流程的特征在于简单的程序,而没有任何分离或洗涤步骤,通常涉及以下方案:a) 将含有未知量分析物的样品(血清或血浆)和分析物特异性测定试剂分配至反应杯中,b) 在杯中,使样品和试剂在规定温度孵育特定时间段,c) 光度计测量与所述样品中分析物的量相关的所述杯中测定溶液的光信号。

[0003] 对于临床化学分析仪例如 Roche Diagnostics cobas® c 提供基于浊度、比浊或比色测定法的广泛测试菜单。在 cobas® c 仪器上检测这些测定法基于具有卤钨灯作为照射源、用于生成单色光的光栅和光电二极管阵列(产生 340 和 800 nm 之间的 12 个波长的 12 个二极管)作为检测器的光度计。

[0004] 经常将关键样品提交用于在临床实验室进行常规生化测试,其显示对应用的测定法的干扰,因此导致改变和错误的结果。当用使用光学方法如比色和浊度方法的实验室测试进行工作时,样品基质中显色或散射光的物质通常引起干扰。此类干扰物质的实例是血红蛋白(溶血)、胆红素(黄疸)和脂质(脂血),其在通常用于分光光度测试的波长吸收或散射光。

[0005] 溶血是一个重要的干扰因素,这通常归因于不同因素对红细胞的体外破坏,诸如分离血清或血浆前血液的长期储存、通过迅速迫使血液经过小针头的剪切力、混合时的过度搅拌或血清的离心和分离的物理作用。体内溶血发生频率较低,但它对实验室测试具有相同的效果。溶血干扰检测程序的机制是由释放的血红蛋白的颜色干扰,尽管还有从受损的红细胞泄漏分析物和红细胞组分与分析物之间的化学相互作用也是可能的原因。作为结果,由于血红蛋白干扰,在临床试验中可以获得错误地更高或错误地更低的分析物浓度。其他血细胞如白细胞和血小板的组分也可以污染样品。例如,细胞衰变可以导致白血病患者血液变化;血小板在凝血过程中的衰变导致血清中较高浓度的细胞内血小板成分。

[0006] 溶血可以进一步由生物化学、免疫学、物理和化学机制引起。输血过程中,补体依

赖性溶血可以由与主要血型抗原反应的抗体引起。物理溶血由低渗对红细胞的破坏,例如用低渗溶液稀释血液,以及降低(真空)或增加的压力引起。机械溶血可以发生在血液在体内流过医疗设备例如导管、心脏瓣膜过程中和由在体外离心不足以及升高的温度而发生。污染物质也可以引起体外溶血。最后,洗涤剂和其他污染物质可以引起溶血。分离血细胞后,溶血通过血清或血浆的红色来检测。在超过 300 mg/L (18.8 mmol/L) 的细胞外血红蛋白浓度,溶血可通过血清或血浆的红色检测。具有治疗性血红蛋白衍生物的样品总是强烈显红色的。一些分析系统通过比较样品在两种波长的吸收测量溶血的程度。用作血液替代品的血红蛋白衍生氧载体的吸收光谱与天然血红蛋白没有显著不同。

[0007] 胆红素是由血红蛋白的酶促降解产生的黄色的色素。关于胆红素干扰的研究大多数基于其中将游离胆红素或水溶性二牛磺酸胆红素(di-taurobilirubin)添加至血清的实验。在特定条件下,胆红素分子在其干扰影响中在定性和定量上不同。当以增加的浓度存在于血液中时,缀合胆红素出现在尿中。在具有蛋白尿的患者中,结合至白蛋白的胆红素也可以出现在尿中。脑内出血后,未缀合(游离)胆红素引起脑脊液的黄变。在血脑屏障的通透性增加时,结合至白蛋白的胆红素可以出现在 CSF 中。胆红素在 340 nm 至 500 nm 之间的波长具有高吸光度。因此,使用这些波长的分光光度测试因为由胆红素引起的持续高的背景吸光度而显示出限制。胆红素干扰导致的结果的明显增加或减少是测定和分析物浓度依赖的。

[0008] 脂血样品是由于增加的脂质含量而具有混浊或乳状外观的血液、血清或血浆的样品。无法避免脂血样品,因为脂质浓度增加经常继发于其他疾病状态诸如:糖尿病、乙醇使用、慢性肾衰竭和胰腺炎。脂血的存在可以通过不同的机制干扰许多临床化学测试,最常见的机制是脂质(主要是乳糜微粒和极低密度脂蛋白 VLDL)对光的散射。作为结果,根据应用的波长和脂质含量,可以改变测定的分析物浓度。

[0009] 总之,样品中血红蛋白、胆红素和脂质以及其他干扰物质的存在可以引起目的在于定量特定分析物的光度测定法的测量结果的正或负的干扰。根据干扰的幅度,结果可以导致错误的解释和不适当的干预。

[0010] 为了克服溶血、黄疸和脂血引起的干扰的缺点,几种方法是文献中已知的。脂血、黄疸和溶血干扰可以通过预分析过程中预处理样品以去除干扰物质而降低,例如在脂血样品的情况下通过高速离心。然而,此类措施增加了工作量,且降低了成本和时间效率;此类措施也易于在样品操作中产生误差。

[0011] 另一种策略是使用其他对干扰不敏感的临床测试。这可能是挑战性的,因为替代测试可能需要实验室中没有的另一个仪器平台;也可能市场上没有任何替代测试。

[0012] 通过使用设置空白程序校正脂血、溶血和黄疸引起的干扰是克服限制的替代方案。这涉及添加测定试剂之前,一旦合适地稀释,测量样品吸光度。从最终吸光度减去测量的吸光度。一种实现这种设置空白程序的策略是利用 2 种不同的试剂(空白和测定试剂)和 2 个杯。这种方法改进了结果,但它具有一个缺点,使测试通量减少一半。另一种方法涉及将试剂依次添加至杯中:在设定时间后获取第一读数;此后添加测定试剂并孵育;最后获取第二读数。然而,用该程序通常仅实现很小改进。此外,建立的测定方案可能不与第一读数所需的样品的新初始稀释步骤相容。

[0013] 双色分析也允许校正分析结果,且经常应用于自动化实验室测试中。第二(侧)

波长用于测量干扰物质。待测定的分析物在该第二波长不吸收。然后从分析物的测量值减去该测量值。这假设干扰物质的吸光度在两种波长是相同的,这种情况是很少的。因此,双色原则在降低干扰中只产生轻微的改进。此外,可能通过化学消除干扰物质来处理干扰,例如用胆红素氧化酶消除胆红素,或用抗坏血酸氧化酶消除维生素 C。

[0014] 此外,多通道分析仪是全自动化的计算机控制系统,其经设计用于分析常规化学测定法、免疫测定法和治疗药物,例如, Roche Cobas 6000 使用分光光度法来进行动力学、终点和非线性反应。到一定程度,系统,类似于大多数现代分析仪,通过应用双试剂程序和双色分光光度法降低了光谱干扰影响。样品的质量可以通过不同的方法来确定。一种常见方法是在实验室分析仪上运行血清指标测试,所述分析仪定量样品中存在的胆红素、血红蛋白和脂质的量。HIL 指标的实施改进了测试结果的精确度和质量。

[0015] 然而,仍然存在许多患者样品显示溶血、胆红素和脂质的干扰,导致错误的结果,甚至通过使用 HLI 指标或校正方法。实验室测定中溶血、胆红素和脂质的分析干扰是实验室医学中最常见的问题。这些改变和错误的结果可以导致不正确的解释、错误的诊断和可能不适当干预以及对于患者的不利结果。作为结果,在血红蛋白、胆红素和脂质的浓度超过特定截止水平的情况下,许多样品必须在预分析步骤中进行预处理,以去除干扰物质,然后重新测量。预处理和重新测量引起额外费用和时间的损失,这两个因素对于进行那些测定的实验室都是关键的。

[0016] 待解决的问题

因此,本发明解决的问题是提供用于测定显示干扰的关键样品中的特定分析物的改进的测定方法,其通过在相应的仪器平台上使用可商购的分光光度实验室测试而实现,而无需应用预分析样品处理或改变测定方法。

[0017] 本发明人已经令人惊讶地发现,显示干扰的样品的改进精确度通过本发明的方法得到实现。预期本发明(至少部分地)克服了显示干扰的样品的预分析样品处理和重新测量的问题,以在光度测定法中测定样品中特定分析物的正确量。

[0018] 发明概述

这些目标中的至少一个通过提供权利要求和下文中定义的主题来实现。

[0019] 在第一个方面,本发明涉及用于通过光度测定法测定可以显示干扰的样品中特定分析物的量的方法,其中所述特定分析物从所述分析物与分析物特异性测定试剂相互作用后反应混合物的光信号变化来定量。对于待测定样品的特定分析物,对于多个波长生成多条校准曲线,将测量结果储存在仪器平台的数据管理系统中。同时进行干扰测试以测定特定分析物,用于定量待测定样品中存在的干扰物质的量。将各干扰物质的量与预定截止值进行比较。在完整反应时间在多个波长测量反应混合物中待测定样品的特定分析物的光信号,且根据干扰物质选择校准曲线。最终,通过与所选波长的所选校准曲线比较来定量待测定样品的特定分析物的量。

[0020] 在第二个方面,本发明涉及用于降低显示溶血和/或黄疸和/或脂血和/或其他干扰的样品的基于分光光度的实验室测试的干扰的方法,其中将包含测量波长、反应时间、校准点、校准模式的特定测量条件额外应用于测量方案,而无需应用预分析样品处理和/或改变测定方法。

[0021] 在进一步方面,本发明涉及额外应用于测量方案的特定测量条件用于降低测定显

示干扰的样品中特定分析物的量的基于分光光度的实验室测试的干扰的用途,所述特定测量条件包含测量波长、反应时间、校准点、校准模式。

[0022] 发明详述

本发明涉及用于通过光度测定法测定可以显示干扰的样品的特定分析物的量的方法,其中在实验室分析仪上,所述特定分析物从所述分析物与分析物特异性测定试剂相互作用后反应混合物的光信号变化来定量。对于待测定样品的特定分析物,对于多个波长生成多条校准曲线,将测量结果储存在仪器平台的数据管理系统中。

[0023] 任选地,进行干扰测试用于定量待测定样品中存在的胆红素和 / 或血红蛋白和 / 或脂质和 / 或其他干扰物质的量,并且将每种干扰物质的量与预定截止值进行比较。同时,在完整反应时间在多个波长测量反应混合物中待测定样品的特定分析物的光信号。根据样品中存在的干扰物质的量和类型选择校准曲线。最终,通过与所选波长的所选校准曲线比较来定量待测定样品的特定分析物的量。

[0024] 本发明的方法进一步提供了额外应用于测量方案的包含反应时间、校准点、校准模式和测定类型的特定测量条件。

[0025] 样品的质量可以通过不同的方法来确定。一种常见方法是在实验室分析仪上运行血清指标测试,所述分析仪定量样品中存在的胆红素、血红蛋白和脂质的量。由此,血清指标和特定分析物的光信号的测量可以在分析仪上同时进行。有时,在高浓度的干扰物质的情况下,甚至可能通过其颜色对血清样品目视分类。

[0026] 通过在特征在于测量波长、反应时间、校准模式、校准点数量(其针对特定分析物应用进行预先确定)的多个条件下生成多条校准曲线,现在可能与标准技术相比更精确地测量这些样品的特定分析物。选择一条或多条校准曲线,所述校准曲线经优化用于减少干扰,导致干扰物质的耐受量的扩大。

[0027] 通过使用本发明的方法,显示干扰的关键样品,例如溶血、黄疸和 / 或脂血样品,现在可以使用相应的仪器平台上可商购的分光光度实验室测试进行测量。本发明人已经令人惊讶地发现,显示干扰的样品的改进精确度通过本发明的方法得到实现,从而避免了需要应用预分析样品处理或改变测定方法或在最坏情况下抛弃样品。

[0028] 定义:

如本文中所使用,术语“测定”意指从基于浊度、比浊或比色测量的光度测定法的反应混合物的光信号的变化,评估、诊断、决定、鉴定、评价、定量或分类样品中的特定分析物。

[0029] 如本文中所使用,术语“量”涵盖分析物的绝对量或所述分析物的相对量和 / 或浓度和 / 或可以与之关联和 / 或可以因此推导的任何值和 / 或参数。

[0030] 如本文中所使用,术语“凝集”主要是其中大分子之间的表面相互作用导致交联且形成大复合物的化学现象。这种大复合物的形成导致光散射特性的增加,取决于复合物的尺寸,这可以用肉眼观察或使用浊度和比浊检测光度监测。

[0031] 术语“分光光度测定法”,也称为“光度测定法”,是本领域众所周知的。光度测定法涵盖浊度和比浊免疫测定法以及比色测定法。在浊度和比浊免疫测定法中,特定分析物从基于所述特定分析物和分析物特异性结合伴侣的凝集的反应混合物的浊度的变化来定量,而在比色测定法中,特定分析物在显色剂的帮助下来定量。

[0032] 根据本发明的术语“比色测定法”通常用于在高度自动化的临床化学分析仪上

的临床诊断。由于其容易的一步程序和其短周转时间,均相比色测定法是用于在自动分析仪中应用的理想候选。实际上提供用于临床化学分析仪的广泛测试菜单,例如 Roche Diagnostics cobas® c。比色测定法的特征在于在待定量的分析物存在的情况下颜色的形成或改变或耗尽,其中颜色的形成或改变或耗尽通常通过分光光度计测量。由于该检测的颜色或光通常在可见区域中,所以你实际上可以看到测定的颜色变化,因此被称为比色测定法。在实验室分析仪上运行的典型比色试验是临床化学试验和酶免疫试验 (CEDIA, EMIT)。MTT 测定法(使用四唑染料作为底物的氧化还原测定法)是除了酶促 NAD(P)H 测定法之外的比色测定法的其他实例。经常使用 UV 光,因为共同辅酶 NADH 和 NADPH 以其还原形式,但不以其氧化形式,吸收 UV 光。因此,使用 NADH 作为底物的氧化还原酶可以通过遵循当其消耗辅酶时 340 nm 波长的 UV 吸光度的降低来测定。甚至当酶反应不导致光的吸光度的变化时,其仍可以可能通过使用偶联测定法使用酶的分光光度测定法。在这里,使用一种反应的产物作为另一种可易于检测的反应的底物。用于偶联测定的一个实例是酶己糖激酶,其可以通过使用葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶将葡萄糖 -6- 磷酸的产生偶联至 NADPH 产生来测定。此类测定在光度计中通过分光光度法检测。在 cobas® c 仪器上检测这些测定基于具有卤钨灯作为照射源和光电二极管阵列 (产生 340 和 800 nm 之间的 12 种波长的 12 个二极管) 作为检测器的光度计。O. D. (光密度,吸光度) 与有色化合物的浓度成正比。如果颜色的发展与溶液中物质的浓度相关,则该浓度可以通过测定适当波长的光吸收程度来测量。本发明的一个实施方案是本发明的方法,其中在比色测定法中,特定分析物在显色剂的帮助下来定量。

[0033] 术语“显色剂”涵盖导致测定的颜色变化、颜色形成或颜色耗尽的任何测定试剂或测定试剂的混合物,所述颜色变化、颜色形成或颜色耗尽可以在光度计上用范围为 340 至 800nm 的典型波长来测量。许多比色测定法涉及在一个或多个步骤反应中导致有色产物的酶和对应底物;颜色变化可以通过对应的酶辅因子如 NAD/ NADH、而不是底物本身来诱导。还存在基于在一个或多个步骤反应中导致产生有色产物的分析物与化学试剂的特异性反应的比色测定法。在比色免疫测定法如 EMIT(酶多联免疫测定技术)或 CEDIA(克隆酶供体免疫测定)中,颜色通常由导致产生具有特征性和可检测的吸收特性的产物的报道酶如 β -半乳糖苷酶或脱氢酶与其对应底物的反应形成。

[0034] 报道酶与底物的反应通常在分析物和抗体的免疫反应(其然后触发或抑制酶反应)之后发生。在其他比色测试中,如用于实验室分析仪的典型临床化学测试中,颜色由分析物与酶或任何其他特定化学试剂或其组合的反应形成、改变或耗尽。在一些情况下,分析物本身充当酶。甚至当酶反应不导致光的吸光度的变化时,其仍可以可能通过使用偶联测定法使用酶的分光光度测定法。在这里,使用一种反应的产物作为另一种可易于检测的反应的底物。用于偶联测定的一个实例是酶己糖激酶,其可以通过使用葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶将葡萄糖 -6- 磷酸的产生偶联至 NADPH 产生来测定。

[0035] 术语“浊度法 (turbidimetry) 和比浊法 (nephelometry)”是本领域已知用于基于测量浊度对光的透射和散射的效果测定溶液中混浊的量或该浊度的方法。液体中的浊度是由细分的悬浮颗粒的存在引起的。如果使光束通过混浊样品,则其强度由散射而降低,并且散射光的量取决于颗粒的浓度、尺寸和尺寸分布。分光光度计测量增加的浊度(即,强度透射光中光的减少),这是由于由免疫凝集反应导致的渐增的粒径引起的。这种增加的浊度是

由分析物引起的免疫凝集的直接量度,或由分析物引起的免疫凝集抑制的间接量度。在比浊法中,测量散射光的强度,而在浊度法中,测量透射通过样品的光的强度。

[0036] 浊度测定法涉及测量当入射光束通过样品时入射光束的强度。光束可以通过悬浮液或被颗粒吸收、反射或散射。作为结果,当光透射通过悬浮液时,光的强度降低。对于非吸收性颗粒,由于散射引起的光强度的降低表示为浊度。

[0037] 比浊测定法是指当入射光束通过样品时,测量从入射光束以定义角度 θ 散射的光。在比浊法中,测量一段时间后的散射光的强度的变化,因为散射物质迅速增加尺寸。当在固定的抗体-胶乳复合物存在的情况下测量时,散射光与初始抗原浓度成比例。进一步的解释描述于 J. A. Molina-Bolivar 等人, *Journal of Macromolecular Science, Part C-Polymer Review*, 45:59-98, 2005。

[0038] 本发明的免疫测定方法在有和没有微粒增强的情况下用所有已知凝集试验都起作用。本发明中优选使用“微粒增强光散射凝集试验”,这也被称为“颗粒增强浊度免疫测定法”(PETIA)。颗粒增强免疫测定法常规用于在临床化学分析仪上定量血清蛋白、治疗性药物和滥用药物的临床诊断中,因为它们具有作为不需要任何分离或洗涤步骤的准均相测定的益处。为了增强反应混合物中特定分析物和分析物特异性结合伴侣之间的光检测,将分析物或分析物特异性结合伴侣连接至合适的颗粒。由此,分析物与用分析物特异性结合伴侣包被的颗粒反应并凝集。随着分析物量逐渐增加,复合物的凝集和尺寸逐渐增加,进一步导致光散射的变化。凝集的颗粒通过浊度和比浊测量法来测定。

[0039] 分析物包括携带对分析物具有高反应性的至少一种结合伴侣的强光散射特性的颗粒和携带对分析物具有低反应性的至少一种结合伴侣的弱光散射特性的颗粒的混合物,如 EP 0898169 中所述。强光散射特性的颗粒具有比弱光散射特性的颗粒更大的尺寸和/或更高的折射率。用于测定分析物的量的微粒增强光散射免疫测定法的微粒试剂,其包括直径为 30 至 600 nm 的微粒的混合物,包括携带对分析物具有高反应性伴侣的至少一种结合伴侣的强光散射特性的颗粒和携带对分析物具有低反应性的至少一种结合伴侣的弱光散射特性的颗粒。

[0040] 微粒的材料可以是适合用于微粒增强光散射测定法的任何无机、有机或聚合物材料。微粒的材料可以是适合用于微粒增强光散射测定法的任何无机、有机或聚合物材料。此类材料包括例如硒、碳、金;碳、硅或锗的氮化物,例如 Si_3N_4 ;铁、钛或硅的氧化物,例如 TiO_2 或 SiO_2 ;和聚合材料,诸如例如聚苯乙烯、聚(氯乙烯)、环氧树脂、聚(偏二氯乙烯)、聚(甲基丙烯酸 α 萘酯)、聚(乙烯基萘)或其共聚物,特别是苯乙烯和可共聚的烯键式不饱和化合物的共聚物,例如,苯乙烯-(甲基)丙烯酸酯共聚物。由聚合材料制成的微粒,以及由从苯乙烯聚合的内核和从苯乙烯与可共聚的烯键式不饱和化合物的共聚形成的外壳组成的核-壳颗粒是特别合适的。大部分基于颗粒的测定法采用胶乳颗粒,其中主要类型是聚苯乙烯。

[0041] 存在颗粒增强浊度免疫测定法(PETIA)的不同的测试形式,竞争性形式和直接形式。直接形式优选适用于具有大尺寸的分析物。这些分析物都是具有多个表位的多价抗原,例如,蛋白和微生物。对于直接形式,颗粒用与分析物凝集的抗体包被。

[0042] 浊度和比浊测定法也可以以竞争性抑制形式进行。这种形式最常用于测量小分子,诸如半抗原,并且通常适用于诊断滥用药物测试和治疗药物监测。在这种形式中,测定

试剂不仅含有分析物特异性结合伴侣,而且含有通过将其连接至微球表面或另一载体分子诸如蛋白(例如牛血清白蛋白)或可溶性聚合物或寡聚物而获得的化学修饰的分析物。与未修饰的分析物相比,该试剂能够在分析物特异性结合伴侣存在的情况下由于分子中存在的多个拷贝的分析物而凝集。样品中的分析物从基于在修饰分析物存在的情况下特定分析物和分析物特异性结合伴侣的聚集的反应混合物的浊度的变化来定量。

[0043] 将抗原连接至交联剂例如聚半抗原,其与样品的抗原竞争如 EP 545350 中显示的抗体的结合位点。在这里,可溶性聚合物、蛋白或微粒充当多个拷贝抗原的载体分子。测试样品中未标记抗原的量是通过其与免疫测定中标记的抗原竞争的能力来测量。未标记抗原阻断标记的抗原结合的能力,因为抗体上的结合位点已经被占用。因此,在竞争性免疫测定中,测定法中测量的较少标记意指存在更多未标记的(测试样品)抗原。

[0044] 根据本发明的术语“分析物”涵盖任何“体外诊断化合物”,诸如例如血清蛋白、治疗性药物和滥用药物。代表分析物包括但不限于抗原、半抗原、抗体、蛋白、肽、氨基酸、激素、类固醇、癌细胞标记、组织细胞、病毒、维生素、核酸、杀虫剂、酶、酶底物和酶辅因子。如本文中所使用,“分析物”或“特定分析物”是指样品中其存在和/或浓度待测定的物质。术语“分析物”包括针对其存在特异性反应伴侣,例如,特异性结合分析物的结合分子或物质,如抗体,或与分析物特异性反应的分子,如酶)或可以针对其制备特异性结合伴侣的任何物质。

[0045] 在本发明的上下文中,术语“特定分析物”意指对于待测量的样品中的每种分析物,可以测定特定校准曲线和特定波长和反应时间,将其针对每种特定分析物优化以定量浓度,且其可以从分析物至分析物有差异。

[0046] 如本文中所使用,术语“分析物特异性反应伴侣”能够与特定分析物反应,从而形成反应复合物,如抗原-抗体免疫复合物,或形成新的产物,如由酶-底物反应导致产生的产物。典型的分析物特异性反应伴侣包括,但不限于,在分析物存在的情况下导致颜色变化的结合蛋白、抗原、抗原片段、抗体、抗体片段、核酸、受体和颗粒增强结合伴侣、酶、底物(在分析物是酶的情况下)、辅因子、特定化学试剂。对于给定分析物特异性的此类反应伴侣可以从商业来源获得,或者可以根据本领域技术人员已知的标准程序制备。分析物特异性反应伴侣对的实例包括,但不限于,半抗原:抗体,细胞:抗体,生物素:抗生物素蛋白,激素:受体,多肽:抗体,寡核苷酸:互补DNA或RNA,酶-底物,酶-辅因子-底物,酶-介质-底物。对于导致形成与分析物的结合复合物的分析物特异性反应伴侣,因为这是抗体的情况,所以术语“分析物特异性结合伴侣”可以同样用来代替“分析物特异性反应伴侣”。

[0047] 如本文中所使用,术语“抗体”是指响应于外来物质的检测产生的免疫球蛋白,并且包括完整分子以及其功能片段,诸如 Fab、F(ab')₂和 Fv。可以用作本发明的测定法中的免疫结合伴侣的抗体包括任何物种的多克隆抗体,任何物种的单克隆抗体(包括嵌合抗体和/或重组抗体)。因为它们被无限量相同产生的能力,所以单克隆抗体或其片段通常是优选的。

[0048] 如本文中所使用,术语“抗原”特征在于其在抗体的抗原结合位点处被结合的能力。被抗体识别且抗体结合的抗原的区域被称为“表位”。抗原是当引入动物或人体时能够诱导免疫应答,即抗体产生,的物质。半抗原是只有当连接至大载体诸如蛋白时才可以引发免疫应答的小分子。载体可以是自身也不会引发免疫应答的载体。一旦机体已经生成针对

半抗原-载体加成物的抗体,小分子半抗原也可以能够结合抗体。

[0049] 如本文中所未使用,术语“样品”是指选自血液即全血、血浆或血清,或尿液,CSF,痰的体液的样品,或是指分离的细胞的样品,或是指来自各个个体的组织或器官的样品。体液样品可以通过众所周知的技术来分离。组织或器官样品可以从任何组织或器官通过,例如,组织活检来分离。分离的细胞可以从体液或组织或器官通过分离技术诸如离心或细胞分选来分离。优选地,来自细胞、组织或器官样品的裂解物从表达或产生本文所述的肽的那些细胞、组织或器官中分离。

[0050] 如本发明中所使用的术语“干扰”被定义为样品中存在的物质改变结果的正确值的影响。如本文中所未使用的显示干扰的样品是指具有一种或多种干扰物质诸如血红蛋白、胆红素和脂质或在通常用于分光光度测试的波长吸收或散射光的其他干扰物质的样品。其他干扰物质是由治疗、滥用或免疫球蛋白引起的药物和药剂。有时,在高浓度的干扰物质的情况下,甚至可能通过其颜色对血清样品目视分类。

[0051] 术语“溶血”被定义为红细胞和其他血细胞的细胞内组分释放到细胞外液,并且可以通过不同的机制引起。体内或体外溶血可以引起结果的明显降低或增加。细胞内浓度比细胞外浓度高 10 倍的细胞组分在溶血过程中在血浆/血清中增加(例如钾、乳酸脱氢酶、天冬氨酸转氨酶)。血浆和血清之间的分析物浓度的差异也是由于血细胞的裂解(基本上通过血小板):因此,神经元特异性烯醇化酶、钾和酸性磷酸酶在血清中较高。

[0052] 血细胞成分可以直接或间接干扰分析物的测量。从红细胞释放的腺苷酸激酶可以导致肌酸激酶和 CK-MB 活性的增加,特别是当测定混合物中腺苷酸激酶的抑制剂是不足时。相反,CK-MB 的免疫化学定量不受腺苷酸激酶影响。游离血红蛋白的假过氧化物酶活性负责通过抑制重氮颜色形成而干扰 Jendrassik 和 Groof 的胆红素程序。从血细胞释放的蛋白酶可以降低凝血因子的活性,同时可以增加纤维蛋白裂解产物形成。

[0053] 如本发明中所使用的术语“胆红素”在血浆中作为游离分子存在和共价结合至白蛋白。在使用浊度原理的凝血分析仪中,超过 25 $\mu\text{mol/L}$ 的胆红素浓度导致抗凝血酶 III 的测量值的临床相关的变化。在较高胆红素浓度,干扰在某些凝血测试中将是显著的。胆红素由于在碱性条件下的氧化导致的吸收降低是在未去蛋白的情况下胆红素干扰 Jaffé 方法的修改方案的主要原因。

[0054] 在强酸性环境中,缀合胆红素的吸收转移到 UV 波长,因此引起用钼磷酸盐方法通过其还原作用测定磷酸盐的干扰。

[0055] 胆红素干扰基于氧化酶/过氧化物酶的测试系统。与其浓度成比例,胆红素可以与测试系统中形成的 H_2O_2 反应,这引起用于测量葡萄糖、胆固醇、甘油三酯、尿酸和肌酸酐的酶促程序的系统性降低的结果。胆红素竞争性干扰染料与白蛋白的结合。

[0056] 如本发明中使用的术语“脂血”被定义为肉眼可见的血清或血浆样品中的浑浊。这通常在高于 300 mg/dl (3.4 mmol/L) 的甘油三酯浓度观察到。浑浊的最常见原因是甘油三酯的浓度增加。脂质干扰几乎所有通过光散射和吸收的光度测量。表观结果可以基于设置空白程序增加或降低。在较高浊度,可能由于该方法线性的限制而无法测量。脂蛋白通过降低样品体积的可用降低分析物的表观浓度,这是由于分析物浓度的计算中包括血浆或血清中的脂蛋白采取的体积。当血浆或血清通过火焰光度法和通过与直接电势测定法相反的使用离子敏感电极的间接测量来测量时,这是脂血血清中较低的钠和钾浓度的原因。当

脂蛋白没有均匀分布在血清 / 血浆样品中时,离心后进行相同的观察:水相中溶解的分析物的浓度在样品上层中小于样品下部相中。对于脂质和脂溶性成分(包括脂蛋白结合的某些药物)的浓度,反过来也是如此。通过脂蛋白提取的成分对于用于检测的试剂诸如抗体可能无法接近。以类似方式,电泳和层析程序可能受到基质中存在的脂蛋白影响。

[0057] 干扰物质的存在和量或其不存在可以通过干扰测试来检测。干扰测试的一个实例是“血清指标”测试,其在实验室分析仪上处理样品的同时进行:通过进行所谓的血清指标,可以计算吸光度测量值,以提供未知样品中存在的黄疸、溶血或脂血水平的半定量表示。可以针对血红蛋白、胆红素和脂质的主要干扰物质生成定量指标值,表示为 H- 指标(溶血)、I- 指标(黄疸)和 L- 指标(脂血)。对于脂血(L)的测量,使用波长 700/660 nm,因为该范围不受溶血和黄疸影响。溶血(H)在 600/570 nm 测量,且针对由于脂血导致的吸收进行校正。黄疸(I)在 505/480 nm 测量,且针对由于脂血和溶血导致的吸收进行校正。可以在处理样品的同时评价样品的质量。基于在 Roche/Hitachi 系统 /Cobas Integra 系统 /cobas 分析仪上测定的特定分析物的血清和血浆的血清指标的干扰的详细列表显示在手册“Cobas, serum indices:reduction of clinical errors in laboratory medicine”中。

[0058] 如本文所使用的术语“截止值”用于干扰物质的定义量。在血清指标测试的情况下,干扰物质的定义量的单位为血清指标值,表示为 H(用于血红蛋白)、L(用于脂质)和 I(用于胆红素)值。

[0059] 如本文所使用的术语“多个波长”是指用本领域中已知的多波长光度计生成的波长。常见光度计是分光光度计或用于浊度免疫测定法的浊度计和用于比浊免疫测定法的比浊计。优选用于比色测定法和浊度和比浊免疫测定法的是分光光度计。在 cobas® c 仪器上检测这些测定法基于具有卤钨灯作为照射源、用于生成单色光的光栅和光电二极管阵列(产生 340 和 800 nm 之间的 12 个波长的 12 个二极管)作为检测器的光度计。光度计,例如 Roche 的分析仪 cobas c® 311 具有同时测量 300 nm 至 800 ± 2 nm 之间的 12 个波长的能力。优选使用的是波长 340、376、415、450、480、505、546、570、600、660、700、800 ± 2 nm。如果用于具有同时测量多个波长的能力的自动分析仪,诸如 cobas c 311,则本发明的方法是特别有利的。根据选择的分光光度计的结构和可用波长(其从设备至设备可不同),从多个波长选择一个或多个特定波长。该测量优选在定义温度,优选 20 和 40 摄氏度之间,最优选在 37°C 进行。

[0060] 如本文中所使用,术语“光信号”描述通过进行反应混合物的吸光度测量而获得的信号。光信号可以是在浊度和比色测定法的情况下的吸光度值,或比浊测定法的散射光信号。样品中特定分析物的光信号可以在多个波长在反应混合物中,优选在完整反应时间在一次运行中,同时测量。根据样品中存在的干扰物质,例如胆红素和 / 或血红蛋白和 / 或脂质和 / 或其他干扰物质,通过与所选校准曲线比较来定量待测定样品的特定分析物的量。用于定量特定分析物的校准曲线的选择可以额外根据对于样品中特定分析物获得的光信号的幅度,因此考虑,样品中特定分析物的浓度是否是低或中或高。

[0061] 通常的做法是通过使用“校准曲线”(通常也称为标准曲线或工作曲线)来确定分析物的浓度,所述校准曲线已经通过绘制标准样品中分析物的已知浓度和标准样品的分析测量值(光信号)诸如光密度之间的相互关系来预先绘制。当校准曲线在定量分析区域中的较宽范围内具有足够线性度时,校准曲线可以用相对较小数量的标准样品来制备,所

述标准样品靠近定量分析的测定范围中的上限、下限和在中间点。然而,在实践中,存在许多通常不是线性的校准曲线。从特定波长的吸光度制备的浊度、比浊或比色测定法的校准曲线可以是非线性的 S 形校准曲线,其中灵敏度在接近零的浓度处变差,并且在较高浓度侧是饱和的。S 形校准的确定需要多点校准,其中必须使用多个浓度的标准样品。

[0062] 当生成用于基于反应混合物的浊度测量的凝集测定法的校准曲线时,波长的选择,除了反应时间之外,对于曲线的斜率(分析灵敏度)和可实现的上部测量范围发挥至关重要的作用。对于直接测定形式,小波长可以导致产生具有高斜率和高信号的校准曲线,而对于高浓度区域,曲线可以变得初期平坦,导致对于高浓度的相当的信号值,且结果也导致低检测上限。另一方面,较大波长可以导致具有小斜率的曲线,但对于在高浓度区域导致可区分的信号值。因此,选择一个波长和对应的反应时间用于目标在于生成校准曲线的信号计算可以是分析灵敏度和上部测量范围之间的折衷。在比色测定法中遇到类似情况。选择形成的有色产物的吸收最大值附近的波长确保了高信号和高灵敏度,另一方面,对于高分析物浓度的信号可以在检测器的指定光范围之外。

[0063] 本发明的校准曲线针对特定分析物预先确定,且通过用于其计算的参数进行表征:波长、反应时间、校准点数量、校准模式和测定类型。为了测定样品的特定分析物,对于多个波长生成多条校准曲线,每种校准曲线针对以下情况进行优化:

- 无干扰样品,
- 溶血样品
- 黄疸样品
- 脂血样品
- 溶血和黄疸样品
- 溶血和脂血样品
- 黄疸和脂血样品
- 溶血、黄疸和脂血样品
- 以及还例如额外考虑样品中存在的特定分析物的量的样品情形,高、低或中。

[0064] 作为具有低浓度特定分析物的黄疸样品的实例,将校准曲线优化用于降低黄疸干扰,且同时实现高分析灵敏度。

[0065] 将测量结果存储在仪器平台的数据管理系统中。通过将样品与分析物特异性测定试剂混合制备测量样品之后,允许反应混合物反应给定的完整反应时间。在完整反应时间在上述用于记录校准曲线的多个波长同时测量反应混合物中待测定样品中特定分析物的光信号。

[0066] 在样品测量的同时,进行干扰测试,如血清指标评估,用于定量待测定样品中存在的胆红素和 / 或血红蛋白和 / 或脂质和 / 或其他干扰物质的量,并且将每种干扰物质的量与预定截止值进行比较。

[0067] 最后,根据干扰测试中发现的干扰选择校准曲线;并且除了干扰以外,也可以考虑样品中分析物的量用于选择校准曲线,其通过样品的光信号的幅度来指示。

[0068] 平行于样品中待测定的特定分析物的测量,在实验室分析仪上进行定量血清指标评价,用于定量主要干扰物质,诸如血红蛋白、胆红素和脂质血清指标。如果针对待测定样品检测干扰物质,则选择波长用于其定量,所述波长在干扰物质的吸收范围之外,但邻近于

待测定的特定分析物的测定混合物的吸收最大值,以确保高信号和最佳灵敏度。

[0069] 对于本发明的每种干扰类型及其组合,建立特定校准曲线。优化校准曲线,以降低对于一定浓度范围的显示干扰的样品的干扰。校准曲线可以在包含测量波长、反应时间、校准模式、校准点数量的多个条件下生成,并且针对每种待测定的特定分析物进行预先确定。将所有测量结果存储在仪器平台的数据管理系统中并自动评价。

[0070] 通过使用这些替代波长和反应时间,其意指在干扰物质不吸收或在较小程度上吸收的波长测量,实现了干扰的降低。

[0071] 如本文所使用的术语“测定类型”是指分析仪上的两种基本类型的光度测定法:终点测定法和速率测定法。测量由光度计在特定时间点进行。如果测量在反应完成后进行,则显色(或浊度)产品的强度是样品组分浓度的指标。这些被称为终点测定法。对于速率测定法,反应速率与分析的样品组分的浓度或活性成比例。测量在反应进行时进行。在该仪器中可能还存在这两种技术的改良,以及两者的组合。

[0072] 如本文中所使用的术语“反应时间”是在终点测定的情况下用于计算其信号值的光信号的第一(或初始)和第二(或最终)测量之间的时间段。第一(或初始)测量在将最终试剂添加至反应混合物之前或之后不久进行。在动力学测量的情况下,反应时间可以是用于计算表示每单位时间的吸光度变化的值的时间段。“反应时间”可以与“完整反应时间”相同或比其更短。完整反应时间是允许由样品和分析物特异性检测试剂构成的反应混合物在它们混合后反应的时间。

[0073] 如本文所使用的术语“校准模式”是指测量的信号[吸光度或(对于速率测定)吸光度变化的速率]和目标分析物的浓度之间的有效关系的确定。此类信号/浓度关系的图形表示是也称为工作曲线的校准曲线。分析仪使用不同类型的数学模型来描述这种关系。这些数学模型被称为校准类型或校准模式。存在两种基本校准模式,线性和非线性校准模式。当针对校准物浓度绘制的吸光度读数位于一条直线上时,线性校准用于测试。如果线性校准基于两个校准物测量,则它被称为线性两点校准。如果它基于多于两种校准物,则其被称为线性多点校准。

[0074] 非线性校准用于其在不同浓度的吸光度形成非线性、但可重复的图的测试。对于校准需要至少三种和最多六种校准物。典型的非线性校准类型是 rodbard 函数。此外,存在校准类型,其校准曲线是分段定义的内插函数,如样条(Spline)。

[0075] 如本文所使用的术语校准点的数量是用于生成校准曲线的也称为样品标准品的校准物的数量。每个经优化以降低某种干扰物质的干扰的校准曲线的实例描述如下:

本发明的一个实施方案是用于未显示干扰的样品的校准曲线 1。

[0076] 本发明的一个进一步实施方案是经优化用于显示溶血干扰的样品的校准曲线 2。

[0077] 本发明的一个进一步实施方案是经优化用于显示黄疸干扰的样品的校准曲线 3。

[0078] 本发明的一个进一步实施方案是经优化用于显示脂血干扰的样品的校准曲线 4。

[0079] 本发明的一个进一步实施方案是经优化用于显示溶血和黄疸或脂血干扰的样品的校准曲线 5。

[0080] 本发明的一个进一步实施方案是经优化用于在低分析物浓度显示溶血和/或脂血和/或黄疸干扰的样品的校准曲线 6。如本文中所使用的术语“校准曲线 6”从在经优化以实现令人满意的检测下限的波长和在经优化以降低干扰的相同时间的反应混合物的光

信号生成。在经优化用于低浓度的特定分析物（从而优化检测下限）的波长和在经优化以降低干扰的相同时间记录校准曲线 6。

[0081] 本发明的一个进一步实施方案是经优化用于在高分析物浓度显示溶血和 / 或脂血和 / 或黄疸干扰的样品的校准曲线 7。如本文中所使用的术语“校准曲线 7”从在经优化以实现令人满意的检测上限的波长和在经优化以降低干扰的相同时间的反应混合物的光信号生成。在经优化用于高浓度的特定分析物（从而优化检测上限）的波长和在经优化以降低干扰的相同时间记录校准曲线 7。

[0082] 本发明的一个进一步实施方案是使用多于 2 条校准曲线，其可以在测量范围定义，各自经优化以降低某一浓度范围的样品的干扰。

[0083] 根据光信号值和干扰物质，理想地，选择如上所述的一种合适的校准曲线，用于定量特定分析物，且特定分析物的量通过与选择的校准曲线比较来定量。

[0084] 如本发明中进行的用多条校准曲线、而不是一条校准曲线工作还可以显示进一步的益处，诸如减轻与所需校准物的数量和浓度相关的问题以及用于校准曲线的曲线拟合程序。

[0085] 通过在特征在于测量波长、反应时间、校准模式、校准点数量（其针对特定分析物应用进行预先确定）的多个条件下生成多条校准曲线，现在可能与标准技术相比更精确地测量这些样品的特定分析物。

[0086] 通过以下标准选择在所选波长和所选反应时间记录的校准曲线，用于定量特定分析物以计算分析物浓度：

1. 为了选择校准曲线，理想地在分析仪上自动作出决定，样品是否显示干扰，如果是，则何种类型的干扰，溶血、黄疸和 / 或脂血。通过将表示为 H- 指标（溶血）、I- 指标（黄疸）和 L- 指标（脂血）的对于每种干扰物质获得的浓度与预定的截止值比较用从干扰测试或血清指标测试获得的数据进行这种决定。作为结果，获得样品中存在的干扰的类型：样品可以是无干扰的，或者是溶血的，或者是黄疸的，或者是脂血的，或者是溶血的和 / 或黄疸的和 / 或脂血的组合。根据存在于样品中的干扰物质，选择校准曲线用于其定量：用于以下的校准曲线

- 无干扰样品，在最佳波长 L(无干扰) 和最佳反应时间 t(无干扰) 记录，或
- 溶血样品，在最佳波长 L(H) 和最佳反应时间 t(H) 记录，或
- 黄疸样品，在最佳波长 L(I) 和最佳反应时间 t(I) 记录，或
- 脂血样品，在最佳波长 L(L) 和最佳反应时间 t(L) 记录，或
- 溶血和黄疸样品，在最佳波长 L(HI) 和最佳反应时间 t(HI) 记录，或
- 溶血和脂血样品，在最佳波长 L(HL) 和最佳反应时间 t(HL) 记录，或
- 黄疸和脂血样品，在最佳波长 L(IL) 和最佳反应时间 t(IL) 记录，或
- 溶血和黄疸以及脂血样品，在最佳波长 L(HIL) 和最佳反应时间 t(HIL) 记录。

[0087] 2. 除了干扰以外，还可以通过考虑样品中存在的分析物量选择校准曲线：此处，进行样品的特定分析物的测量的光信号的幅度与预定阈值的比较，以决定样品是否具有高或低的分析物浓度。在此类情况下，将生成两条校准曲线来覆盖用于定量分析物的测量范围，

- 对于低浓度样品，在最佳第一波长和最佳第一反应时间记录的第一校准曲线，和

- 对于高浓度样品,在最佳第二波长和最佳第二反应时间记录的第二校准曲线。

[0088] 根据测量的样品是否产生超过或低于阈值的其计算的光信号或浓度值,将使用两条校准曲线之一用于定量分析物。如果必要,可以考虑更多浓度水平,如高、中和低浓度水平之间的差异;在这种情况下,定义 2 个预定阈值以选择校准曲线。

[0089] 如本文中所使用,术语“第一波长”和第一反应时间针对特定分析物的低浓度进行优化,从而尽可能提高检测下限。这意指第一波长组合第一反应时间生成,例如,在直接测定形式的情况下的高信号,导致具有高分析灵敏度的校准曲线。

[0090] 灵敏度、分析灵敏度、检测下限 (LDL)、空白限值 (LOB)、检测限值 (LOD) 和定量限值 (LOQ) 是用来描述可以通过分析方法可靠测量的量度的最小浓度的术语。所有这些术语都相关,但具有不同的定义 (siehe Lit. clin biochem rev 2008, 29, 49)。例如,术语“分析灵敏度”被定义为校准曲线的斜率。如本文中所使用,术语“检测下限” (LDL) 也被称为较低测量范围。估计 LDL 的一种典型方法由测量零校准物或空白样品的重复 (诸如 $n=21$), 确定平均值 \bar{x} 和标准偏差 (SD) 组成。LDL 计算为 $\bar{x}+2SD$ 或 $\bar{x}+3SD$ 。这种用于 LDL 测定的方法根据 Kaiser (H. Kaiser, Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie, 1965, 209, Nr. 1, 第 1-18 页) 描述的方法。如果 (在完整反应时间至少在第一和第二波长同时测量的样品的光信号中) 样品的至少一种光信号或其计算的至少一个信号值低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过与对于具有渐增校准曲线的测定的第一波长和第一反应时间的校准曲线的比较来确定。

[0091] 如本文中所使用,术语“第二波长”和第二反应时间针对特定分析物的高浓度进行优化,从而尽可能提高检测上限。这意指第二波长和第二反应时间生成,例如,在直接测定形式的情况下上部测量范围中不同分析物浓度的可区分信号,导致具有高上部测量范围的校准曲线。

[0092] 第一和第二波长是不同的,理想地相差至少 5nm,或是相同的,并且,第一和第二反应时间可以是不同或相同的。

[0093] 如本文中所使用,术语“检测上限” (UDL) 也被称为上部测量范围。UDL 是可以可靠地测定的样品中分析物的最高量。在本发明中,UDL 通过评价该方法的线性度、然后选择线性范围内的最高浓度值作为 UDL 来测定。当从一系列样品溶液的分析物回收率 (测量值) 与样品溶液中分析物的实际浓度 (真实值) 成比例时,该方法被称为是线性的 (Arch Pathol Lab Med 2004, 128, 第 44-48 页)。校准曲线的形式 (其可以是抛物线或 S 形的) 不应当与描述测量值和真实值之间关系的方法的线性度混淆。校准曲线描述信号和浓度之间的关系。

[0094] 在本发明上下文中的术语“动态范围”描述测定法的测量范围的量级,且在此被定义为检测上限 (UDL) 与检测下限 (LDL) 的比率。如果没有另外说明,我们使用术语测量范围作为在 LDL 开始且在 UDL 结束的浓度值。主要地,除了 LDL 以外,可以使用其他灵敏度术语,如 LOD 或 LOQ,并且除了 UDL 以外,描述上部测量范围的还有其他术语也可以用于计算动态范围。

[0095] 根据用于测量分析物的现有技术,本发明的波长是所谓的“主要波长”。

[0096] 本发明的一个实施方案是,任选地,进一步波长被测定为用于校正干扰和补偿光度噪声的空白值,也称为双色测量 (clin. Chem. 1979, 25, 1482 - 1484)。对于两个主要

波长中每一个,如果记录进一步的波长用于通过从主要波长的信号减去校正波长的信号的校正目的,这是任选的。

[0097] 对于选择用于定量显示干扰的样品中的特定分析物的各波长和反应时间,用同时测量的标准样品构建一条或多条校准曲线。

[0098] 如本文中所使用的术语“阈值”用于本方法的分析物的定义吸光度值或定义量,例如表示为浓度值;优选使用浓度值。当对于分析物的定量使用一条或多条校准曲线覆盖测量范围时,将阈值应用于本发明的方法。通常,使用 2 条校准曲线,经优化用于定量具有低分析物浓度的样品的第一校准曲线,和经优化用于定量具有高分析物浓度的样品的第二校准曲线。理想地,阈值取自两条校准曲线从第一校准曲线改变至第二校准曲线的点。如实施例 2 和图 3 中所示,对于苯巴比妥测定,两条校准曲线用于定量脂血样品,第一校准曲线覆盖 0 至 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度,第二校准曲线覆盖 45 至 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。在这种情况下下的阈值为 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在与临床决定值不一致的浓度选择阈值对于 IVD 测定是重要的。

[0099] 对于阈值的选择,通常存在广泛的灵活性。重要的是,在选择阈值,两条校准曲线都满足与该方法的线性度和与精确度以及与灵敏度相关的要求。例如,第二校准曲线理想地应当具有至少覆盖在所选阈值的浓度的 LDL;且第一校准曲线理想地应当显示至少直至所述选择的阈值的该方法的线性度。

[0100] 一种可能用于选择用于本发明的校准曲线的最佳测量条件的程序包括以下步骤:

1. 首先,在多个波长生成一系列日期。对于我们的实施例 1 和 2,在完整反应时间在例如 cobas c 311 分析仪上可用的 12 个波长同时进行以下样品的吸光度值的测量:

- 用于校准的一式两份的至少 2 至 6 种标准品,
- 用于测定 LDL 的 21 份重复的空白样品 (分析物浓度 = 0),
- 用于测定精确度 (变异系数) 的 21 份重复的至少 2 种样品 (2 种不同的分析物浓度),
- 用于测定该方法的 UDL 和线性度的覆盖例如比已知 UDL 高 2-4 倍的分析物浓度的稀释系列
- 用于模拟含有渐增量干扰物质的关键样品的含有分析物和渐增量的干扰物质 (血红蛋白、胆红素和 / 或脂质) 的样品。

[0101] 2. 根据现有技术的方法完成用于定量无干扰样品的校准曲线的最佳波长和反应时间的选择。

[0102] 3. 用于定量具有干扰物质的样品的校准曲线的最佳波长和反应时间的选择通过选择以下波长来完成,所述波长在干扰物质的吸收范围之外或几乎之外,但其仍然最接近于对于待测定的分析物特异性的测定混合物吸收最大值,以确保高信号,和因足够的灵敏度。然后使用点 1 中生成的数据通过试验和误差方法选择最佳反应时间:

对于具有固定分析物浓度且用渐增量的干扰物质掺入的样品系列,在试验和误差程序中对于不同条件 (如上定义的最佳波长,反应时间) 确定理论分析物浓度 (无干扰的样品的浓度) 的回收率。当理论分析物浓度的回收率在 $\pm 10\%$ 之内时,在给定浓度的干扰物质被定义为耐受的 (或者显示无干扰)。选择相比于高浓度的干扰物质产生最佳耐受的波长和反应时间。

[0103] 对于这些选择的波长和反应时间,计算 UDL 和 LDL,且选择产生最佳测量范围的条件(波长和反应时间)用于校准曲线。理想地,应当覆盖测量范围,其与用来自点 2 的无干扰样品实现的测量范围相当。在实施例 1 中,应用该程序。

[0104] 4. 选择用于定量具有干扰物质的样品的校准曲线的最佳波长和反应时间且同时额外考虑分析物量由降低干扰且同时获得具有最佳测量范围的校准的目标所驱动。为了该目的,定义至少两条校准曲线:用于低分析物浓度且因此覆盖测量范围的低端的在第一波长和第一反应时间记录的第一校准曲线,和用于高分析物浓度且因此覆盖测量范围的高端的第二波长和第二反应时间记录的第二校准曲线。用于选择最佳条件的可能方法包括:

- 对于如点 3 中所述的给定干扰选择最佳波长,

- 然后,对于至少一种具有低分析物浓度的样品系列和一种具有高分析物浓度的样品系列,每种样品系列掺入渐增量的干扰物质,在试验和误差程序中对于不同条件(如点 3 中定义的最佳波长,反应时间)确定理论分析物浓度(无干扰的样品的浓度)的回收率。当理论分析物浓度的回收率在 $\pm 10\%$ 之内时,在给定浓度的干扰物质被定义为耐受的(或者显示无干扰)。选择相比于高浓度的干扰物质产生最佳耐受的波长和反应时间。

[0105] 对于这些选择的波长和反应时间,计算 UDL(对于高分析物样品)和 LDL(对于低分析物样品),且选择产生最佳测量范围的条件(波长和反应时间)用于第一校准曲线(低分析物样品)和第二校准曲线(高分析物样品)。理想地,应当覆盖测量范围,其与用来自点 2 的无干扰样品实现的测量范围相当。在实施例 2 中,应用该程序。

[0106] 本发明的一个实施方案是提供用于校正校准曲线的情况。

[0107] 如本文中所使用,术语“完整反应时间”是在多个波长测量特定分析物的时间段。为了选择最佳的两个波长(目的在于生成两条校准曲线),在 cobas c® 仪器上可用的 12 个不同波长同时测量标准品。仅考虑处于检测器的光学范围内的吸光度值(0.0000 - 3.0000 吸光度)。

[0108] 本免疫测定时间的典型完整反应时间在 1 到 20 分钟之间变化。优选地,多波长分光光度计光度计的完整反应时间优选为 10 分钟左右。本发明的一个实施方案是在完整反应时间过程中测量特定分析物的光信号。最优选地,至少在第一和第二主要波长同时测量特定分析物的光信号。如本文中所使用,术语“时间延迟”是用于检测特定分析物的第一和第二主要波长之间的时间段。

[0109] 如本发明中所使用,术语“同时”可意指小于 60x 秒的时间延迟,例如小于 10x 秒、优选小于 1x 秒、最优选小于 1 ms 或者甚至小于 0.1x ms 的时间延迟。最优选地,术语“同时”意指没有时间延迟。

[0110] 本发明的一个进一步方面是用于降低显示溶血和/或黄疸和/或脂血干扰的样品的基于分光光度的实验室测试的干扰的方法,其中将包含测量波长、测定点、校准点和校准模式的特定测量条件额外应用于测量方案,而无需应用预分析样品处理和/或改变测定方法。

[0111] 一个实施方案进一步是根据本发明的方法,其中根据样品是否是溶血的和/或脂血的和/或黄疸的选择多条校准曲线中的一条或多条,且通过与选择的校准曲线的比较定量特定分析物的量。

[0112] 本发明的一个进一步方面是额外应用于测量方案的特定测量条件用于降低测定

可以显示溶血和 / 或黄疸和 / 或脂血干扰的样品中特定分析物的量的基于分光光度的实验室测试的干扰的用途,所述特定测量条件包含测量波长、反应时间、校准点、和校准模式。

[0113] 本发明的一个进一步方面是使用用于测量样品中特定分析物的量的可商购的分光光度实验室测试的仪器平台,所述样品可以显示溶血和 / 或黄疸和 / 或脂血干扰,其中所述仪器平台的数据管理系统能够处理反应时间、校准点、校准模式、波长、血清指标的数据,用于选择最佳拟合校准曲线。

[0114] 附图简述

图1 显示干扰物质胆红素、血红蛋白和脂质的吸收光谱。

[0115] 图2 显示如实施例 1 中所述根据本发明的方法用于降低 CRP 测定中的溶血干扰的可能工作流程。

[0116] 图3 显示如实施例 2 中所述根据本发明的方法用于降低苯巴比妥测定中的脂血干扰的可能工作流程。

实施例

[0117] 实施例 1 :CRP 测定中溶血干扰的降低

本发明用于降低溶血样品的干扰的方法的益处使用 Roche 的商业 CRP L3 测定法、胶乳增强浊度免疫测定法和 Roche 的 cobas c311 分析仪进行评价。

[0118] 仪器 cobas c311:

具有多波长分光光度计作为检测单元的 Roche 的 (Roche Diagnostics GmbH) cobas c311 分析仪用于本实验。该仪器自动移取样品和检测试剂至反应室 (reaction cells)。可以将多达 3 种不同试剂 R1、R2 和 R3 添加至样品。该仪器使用卤钨灯作为照射源 (12 V / 50 W),并用由 12 个光电二极管组成的光电二极管阵列在 12 种不同波长 (在 340、376、415、450、480、505、546、570、600、660、700 和 800 ± 2 nm) 同时测量吸光度。光路长度为 5.6 mm,且检测器的光范围为 0.0000 - 3.0000 吸光度。对于每个反应室 (reaction cell),测量水空白,然后在 10 分钟 (在这里也称为完整反应时间) 内 57 次采集吸光度读数,因此对于每个波长的吸光度得到总共 57 个测量点,也称为光度点或测定点。浓度可以通过使用这些测量点中的至少一个来计算。在该仪器上存在两种基本类型的光度测定法:终点测定法和速率测定法。测量在 37 摄氏度进行。

[0119] CRP L3 测定法 :

Roche 的 CRP L3 测试 (CRPL3, 目录号 04956842) 的测定原理:具有用单克隆抗 CRP 抗体包被的胶乳颗粒的人 CRP 凝集物;浊度测定该聚集物。

[0120] cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒 (cassettes) 包含一至三个特别设计的试剂瓶,且具有详细的相关试剂和测试的条形码标记。对于 CRP L3 测试,盒中使用两种试剂:R1 (具有牛血清白蛋白和防腐剂的 TRIS 缓冲液) 和 R2 (用甘氨酸缓冲液中的抗 CRP (小鼠)、免疫球蛋白 (小鼠) 和防腐剂包被的胶乳颗粒)。来自 CRP L3 测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

[0121] 移取方案:随后将 2 μ L 样品和 150 μ L 试剂 R1 添加至反应室,随后添加 48 μ L 试剂 R2,用 24 μ L 稀释液 (水) 稀释,并混合反应混合物。

[0122] 测量条件:对于测量,使用 570nm 作为主要波长,且使用 800nm 作为校正波长。测

定类型是两点终点测定法。两点终点测定法是执行样品空白的终点测定法。在这里考虑在两个不同测量点的两个吸光度读数：通常在添加最终试剂之前或之后不久采集第一读数；在添加最终试剂之后任何时间点采集第二读数。用于校准曲线和因此用于浓度计算的吸光度值通过从第二读数减去第一读数而获得。对于 CRP L3, 第一读数是在测量点 8, 且意指添加最终试剂之后不久, 第二读数在测量点 18, 其对应于 2.0 分钟的反应时间。为了生成校准曲线, 一式两份测量来自 Roche (目录号 11355279) 的 6 份标准品, 使用样条 (spline) 作为校准模式, 其拟合通过三阶多项式近似的测量校准物的数据点之间的范围, 从而使得获得平滑校准曲线。

[0123] 用于评价干扰的程序：

CRP L3 测定用无干扰和溶血样品运行, 其使用包装插页文献中描述的标准方法 (参见下文, a), 和与标准方法相比使用其他波长用于吸光度测量的新方法 (参见下文, b)。在 cobas c311 上一式三份测量样品。最后, 评价用两种方法获得的溶血干扰的幅度: 对于所有含有血红蛋白的样品计算测量的 CRP 浓度的回收率 (中值), 并与用无干扰样品获得的 CRP 值进行比较。当初始 CRP 浓度值的回收率在 $\pm 10\%$ 内时, 样品是无干扰的; 落在该回收率区域内的结果是可报道 (准确) 的结果。

[0124] 溶血血清样品: 通过将不同的血红蛋白量添加至 ~ 154 和 ~ 1397 mg/dL 之间的浓度且用人 CRP 掺入至 5 mg/L 而生成。

[0125] 无干扰血清样品: 通过用人 CRP 掺入至 5 mg/L 而生成。

[0126] a) 标准方法:

- 主要波长 :570 nm
- 次要波长 (用于校正目的) :800 nm
- 完整反应时间 / 反应时间 :10 min / 2.0 min
- 6 点校准
- 校准模式 :样条 (spline)
- 测定类型 :终点 (2 点终点)

b) 新方法:

- 主要波长 :600 nm
- 次要波长 (用于校正目的) :800 nm
- 测定时间 / 反应时间 :10 min / 2.0 min
- 6 点校准
- 校准模式 :样条 (spline)
- 测定类型 :终点 (2 点终点)。

[0127] 结果:

如表 1 中所示, 当使用标准方法时, 在最高达 612 的 H 指标 (~ 612 mg/dl 的血红蛋白浓度) 没有发现溶血的干扰。对于较高的 H 指标, 回收率在 $\pm 10\%$ 窗口之外。

[0128] 如表 2 中所示, 当使用新方法时, 在最高达至少 1397 的 H 指标 (~ 1397 mg/dl 的血红蛋白浓度) 没有发现溶血的干扰。

[0129] 该结果显示当使用新方法时关于测定耐受的溶血程度改进约 2.3 倍。换言之, 通过应用新方法, 溶血干扰降低 2.3 倍。对于新方法的实施, 不需要试剂配制的任何变化; 只

有分析仪的软件必须适用于方法的完全自动化处理。

[0130] CRPL3 测定的新方法的应用由于波长和反应时间的变化导致测定表现的一些变化：尽管检测上限 (UDL) 保持类似于标准方法,但检测下限 (LDL) 稍微受损 (0.06 mg/L 至 0.09 mg/L)。

[0131] 对于该测定,根据本发明的分析仪上的可能工作流程将是 (也参见图 2)：

- 对于 CRP 生成校准曲线
- 在标准条件下记录的校准曲线 (标准方法 a)
- 在新条件下记录的校准曲线 (新方法 b)
- 在以下测定中同时测量样品
- 血清指标测定和
- 至少在以下波长的 CRPL3 测定 :570nm、600nm、800nm
- 基于血清指标测定中获得的 H 指标值和其与截止值的比较 ($H = 612$, $H = 1397$),由分析仪选择相应的校准曲线用于定量样品中的 CRP：
 - $H \leq 612$: 在标准条件下记录的校准曲线 (标准方法 a)
 - $H > 612$, $H \leq 1397$: 在新条件下记录的校准曲线 (新方法 b)
 - $H > 1397$: 抛弃样品
 - 通过光信号与所选校准曲线的比较测定样品中的 CRP 量。

表 1: 标准方法的数据

理论的CRP浓度 (mg/L)	H-指标	标准方法		
		测量的CRP浓度 (mg/L)	相比于 H-指标0 的偏差	回收 百分比
5	0	4.31		100%
5	154	3.99	-7%	93%
5	304	4.00	-7%	93%
5	462	3.89	-10%	90%
5	612	4.01	-7%	93%
5	717	3.83	-11%	89%
5	919	3.80	-12%	88%
5	1085	3.78	-12%	88%
5	1240	3.74	-13%	87%
5	1397	3.70	-14%	86%

表 2: 新方法的数据:

理论的CRP浓度 (mg/L)	H-指标	新方法		
		测量的CRP浓度 (mg/L)	相比于 H-指标0 的偏差	回收 百分比
5	0	4.3		100%
5	154	4.0	-7%	93%
5	304	4.0	-6%	94%
5	462	4.0	-7%	93%
5	612	4.1	-4%	96%
5	717	4.0	-7%	93%
5	919	4.0	-7%	93%
5	1085	4.0	-6%	94%
5	1240	4.0	-6%	94%
5	1397	4.0	-7%	93%

[0132] 实施例 2: 苯巴比妥测定中脂血干扰的降低

本发明用于降低脂血样品的干扰的方法的益处使用 Roche 的商业苯巴比妥测定法、胶乳增强浊度免疫测定法 (KIMS: 溶液中微粒的动力学相互作用) 和 Roche 的 cobas c311 分析仪进行评价。

[0133] 仪器 cobas c311:

具有多波长分光光度计作为检测单元的 Roche 的 (Roche Diagnostics GmbH) cobas c311 分析仪用于本实验。该仪器自动移取样品和检测试剂至反应室 (reaction cells)。可以将多达 3 种不同试剂 R1、R2 和 R3 添加至样品。该仪器使用卤钨灯作为照射源 (12 V / 50 W), 并用由 12 个光电二极管组成的光电二极管阵列在 12 种不同波长 (在 340、376、415、450、480、505、546、570、600、660、700 和 800 ± 2 nm) 同时测量吸光度。光路长度为 5.6 mm, 且检测器的光范围为 0.0000 - 3.0000 吸光度。对于每个反应室 (reaction cell), 测量水空白, 然后在 10 分钟 (在这里也称为完整反应时间) 内 57 次采集吸光度读数, 因此对于每个波长的吸光度得到总共 57 个测量点, 也称为光度点或测定点。浓度可以通过使用这些测量点中的至少一个来计算。在该仪器上存在两种基本类型的光度测定法: 终点测定法和速率测定法。测量在 37 摄氏度进行。

[0134] 苯巴比妥测定:

Roche 的苯巴比妥测试 (目录号 04490924) 的测定原理: 将苯巴比妥抗体共价偶联至

微粒,并将药物衍生物连接至大分子。溶液中微粒的动力学相互作用通过药物缀合物与微粒上的抗体的结合诱导,且通过样品中苯巴比妥的存在抑制。血清样品中的药物缀合物和苯巴比妥之间发生竞争性反应以结合微粒上的苯巴比妥抗体。所得微粒的动力学相互作用与样品中存在的药物量成反比(indirectly proportional)。

[0135] cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒(cassettes)包含一至三个特别设计的试剂瓶,且具有详细的相关试剂和测试的条形码标记。对于苯巴比妥测试,盒中使用两种试剂:R1(具有苯巴比妥缀合物、防腐剂 and 稳定剂的缓冲液)和 R2(用缓冲液中的苯巴比妥抗体(小鼠单克隆)、防腐剂和稳定剂包被的胶乳颗粒)。来自苯巴比妥测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

[0136] 移取方案:随后将 2 μ L 样品和 93 μ L 试剂 R1 添加至反应室,随后添加 93 μ L 试剂 R2,并混合反应混合物。

[0137] 测量条件:对于测定,使用 600nm 作为主要波长,且使用 800nm 作为校正波长。测定类型是两点终点测定法。两点终点测定法是执行样品空白的终点测定法。在这里考虑在两个不同测量点的两个吸光度读数:通常在添加最终试剂之前或之后不久采集第一读数;在添加最终试剂之后任何时间点采集第二读数。用于校准曲线和因此用于浓度计算的吸光度值通过从第二读数减去第一读数而获得。对于苯巴比妥,第一读数是在测量点 10,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 49,其对应于 6.5 分钟的反应时间。为了生成校准曲线,一式两份测量来自 Roche(目录号 03375790)的 6 份标准品,使用 RCM(Rodbard 函数)作为校准模式。

[0138] 用于评价干扰的程序:

苯巴比妥测定用无干扰和脂血样品运行,其使用包装插页文献中描述的标准方法(参见下文, a),和与标准方法相比使用其他波长用于吸光度测量的新方法(参见下文, b)。在 cobas c311 上一式三份测量样品。最后,评价用两种方法获得的脂血干扰的幅度:对于所有含有脂质的样品计算测量的苯巴比妥浓度的回收率(中值),并与用无干扰样品获得的苯巴比妥值进行比较。当初始苯巴比妥浓度值的回收率在 $\pm 10\%$ 内时,样品是无干扰的;落在该回收率区域内的结果是可报道(准确)的结果。

[0139] 脂血血清样品:通过将不同的英脱利匹特(intralipid)量添加至 ~ 6 和 ~ 1903 mg/dL 之间的浓度且用苯巴比妥分别掺入至 5 和 45 μ g/mL 而生成。

[0140] 无干扰血清样品:通过用苯巴比妥分别掺入至 5 和 45 μ g/mL 而生成。

[0141] a) 标准方法:

- 主要波长 :600 nm
- 次要波长(用于校正目的):800 nm
- 完整反应时间 / 反应时间 :10 min / 6.5 min
- 6 点校准
- 校准模式 :RCM (Rodbard)
- 测定类型 :终点 (2 点终点)

b) 新方法:

对于苯巴比妥浓度 5 μ g/mL:

- 主要波长 :505 nm

- 次要波长（用于校正目的）:800 nm
- 完整反应时间 / 反应时间 :10 min / 6.5 min
- 6 点校准
- 校准模式 :RCM (Rodbard)
- 测定类型 :终点 (2 点终点)

对于苯巴比妥浓度 45 μ g/mL :

- 主要波长 :450 nm
- 次要波长（用于校正目的）:800 nm
- 完整反应时间 / 反应时间 :10 min / 3.6 min
- 6 点校准
- 校准模式 :RCM (Rodbard)
- 测定类型 :终点 (2 点终点)。

[0142] 结果:

如表 3 中对于 5 μ g/mL 的苯巴比妥浓度所示,当使用标准方法时,在最高达 598 的 L 指标 (~598 mg/dl 的英脱利匹特浓度) 没有发现脂血的干扰。对于较高的 L 指标,回收率在 +/- 10% 窗口之外。

[0143] 如表 4 中对于 5 μ g/mL 的苯巴比妥浓度所示,当使用新方法时,在最高达 902 的 L 指标 (~902 mg/dl 的英脱利匹特浓度) 没有发现脂血的干扰。

[0144] 如表 5 中对于 45 μ g/mL 的苯巴比妥浓度所示,当使用标准方法时,在最高达 802 的 L 指标 (~802 mg/dl 的英脱利匹特浓度) 没有发现脂血的干扰。对于较高的 L 指标,回收率在 +/- 10% 窗口之外。

[0145] 如表 6 中对于 45 μ g/mL 的苯巴比妥浓度所示,当使用新方法时,在最高达 1262 的 L 指标 (~1262 mg/dl 的英脱利匹特浓度) 没有发现脂血的干扰。

[0146] 这些结果显示当使用新方法时关于测定耐受的脂血程度改进约 1.5 倍 (参见表 7)。换言之,通过应用新方法,脂血干扰降低 1.5 倍。对于新方法的实施,不需要试剂配制的任何变化;只有分析仪的软件必须适用于方法的完全自动化处理。

[0147] 苯巴比妥测定的新方法的应用没有导致由于波长和反应时间的变化而引起的测定性能的任何变化;LDL 和 UDL 仍然类似于标准方法。

[0148] 因此,对于该测定,根据本发明的分析仪上的可能工作流程将是 (也参见图 3):

1. 对于苯巴比妥生成校准曲线
 - 在标准条件下记录的校准曲线 (标准方法 a)
 - 在新条件下记录的两条校准曲线 (新方法 b)
2. 在以下测定中同时测量样品
 - 血清指标测定和
 - 至少在以下波长的苯巴比妥测定 :450nm、505nm、600nm、800nm
3. 基于血清指标测定中获得的 L 指标值和其与截止值的比较 (L1= 598、L2=902、L3=1262),且基于通过比较在苯巴比妥测定中获得的样品的光信号与预定阈值 T1 (T1 可以用标准方法测量的校准曲线中对应于 45 μ g/ mL 的苯巴比妥浓度的光信号) 对苯巴比妥浓度的粗略估计,

由分析仪选择相应的校准曲线用于定量样品中的苯巴比妥：

- $L \leq 598$ → 不依赖于其中的苯巴比妥浓度, 在标准条件 (标准方法 a) 下记录的校准曲线

- $L > 598$ → 通过比较苯巴比妥测定中来自样品的测量的光信号和相应的阈值基于发现的 L 指标且还基于样品中粗略苯巴比妥浓度选择校准曲线：

- 如果 $L > 598$ 且 $L \leq 902$ 以及

如果测量的光信号表明苯巴比妥浓度

$< 45 \mu\text{g/mL}$ ：

→ 在新条件 (新方法 b, 对于 $5\mu\text{g/mL}$ 苯巴比妥的条件) 下记录的校准曲线

- 如果 $L > 598$ 且 $L > 902$ 以及

如果测量的光信号表明苯巴比妥浓度

$< 45 \mu\text{g/mL}$ ：

→ 抛弃样品

- 如果 $L > 598$ 且 $L \leq 1262$ 以及

如果测量的光信号表明苯巴比妥浓度

$\geq 45 \mu\text{g/mL}$ ：

→ 在新条件 (新方法 b, 对于 $45\mu\text{g/mL}$ 苯巴比妥的条件) 下记录的校准曲线

- 如果 $L > 598$ 且 $L > 1262$ 以及

测量的光信号表明苯巴比妥浓度

$\geq 45 \mu\text{g/mL}$ ：

→ 抛弃样品

4. 通过比较光信号和选择的校准曲线测定样品中的苯巴比妥量。

表 3: 5 $\mu\text{g/ml}$ 苯巴比妥: 标准方法的数据(600-800nm, 6.5 min)

理论的苯巴比妥浓度($\mu\text{g/mL}$)	L指标	标准方法		
		测量的苯巴比妥浓度($\mu\text{g/mL}$)	相比于L-指标0的偏差	回收百分比
5	7	4.6		100%
5	145	4.7	0.1	102%
5	292	4.6	0.0	99%
5	453	4.4	-0.3	94%
5	598	4.2	-0.4	91%
5	736	3.9	-0.7	85%
5	902	3.6	-1.0	78%
5	1056	3.3	-1.3	71%
5	1289	3.0	-1.6	66%
5	1349	2.8	-1.8	61%
5	1485	2.4	-2.2	51%

表 4: 5 $\mu\text{g/ml}$ 苯巴比妥: 新方法的数据(505-800nm, 6.5 min)

理论的 苯巴比妥浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	L指标	新方法		
		测量的 苯巴比妥浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	相比于 L-指标0 的偏差	回收 百分比
5	7	4.6		100%
5	145	4.8	0.2	104%
5	292	4.7	0.1	102%
5	453	4.6	0.0	99%
5	598	4.6	-0.1	99%
5	736	4.4	-0.2	95%
5	902	4.2	-0.4	92%
5	1056	4.1	-0.5	89%
5	1289	4.0	-0.6	87%
5	1349	4.0	-0.6	86%

表 5: 45 $\mu\text{g/ml}$ 苯巴比妥: 标准方法的数据(600-800nm, 6.5 min)

理论的 苯巴比妥浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	L指标	标准方法		
		测量的 苯巴比妥浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	相比于 L-指标0 的偏差	回收 百分比
45	6	39.6		100%
45	154	39.1	-1%	99%
45	313	38.8	-2%	98%
45	472	38.3	-3%	97%
45	656	37.7	-5%	95%
45	802	37.0	-7%	93%
45	967	35.3	-11%	89%
45	1262	33.9	-14%	86%
45	1419	30.6	-23%	77%
45	1526	31.4	-21%	79%
45	1670	31.0	-22%	78%
45	1780	29.2	-26%	74%
45	1903	28.5	-28%	72%

表 6: 45 $\mu\text{g/ml}$ 苯巴比妥: 新方法的数据(450-800nm, 3.6 min)

理论的 苯巴比妥浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	L指标	新方法		
		测量的 苯巴比妥浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	相比于 L-指标0 的偏差	回收 百分比
45	6	40.2		100%
45	154	40.2	-0.1%	100%
45	313	39.6	-2%	98%
45	472	39.6	-2%	98%
45	656	39.2	-2%	98%
45	802	38.5	-4%	96%
45	967	37.4	-7%	93%
45	1262	36.8	-9%	91%
45	1419	34.3	-15%	85%
45	1526	35.2	-12%	88%
45	1670	34.2	-15%	85%
45	1780	33.4	-17%	83%
45	1903	33.4	-17%	83%

表 7: 目的在于降低脂血干扰的苯巴比妥的标准和新方法的比较

在以下分析物浓度评价的干扰	用标准方法*耐受的干扰物质 [§] 的量	用新方法*耐受的干扰物质 [§] 的量	改进倍数
5 μ g/mL 苯巴比妥	600nm-800nm, 6.5min: L指标 \leq 598	505nm-800nm, 6.5min: L指标 < 902	1.5
45 μ g/mL 苯巴比妥	L指标 \leq 802	450nm-800nm, 3.6min: L指标 < 1262	1.5

* 通过表明使用的主要波长、校正波长、反应时间描述方法

[§]L 指标 1 为约 1 mg/dL 脂质。

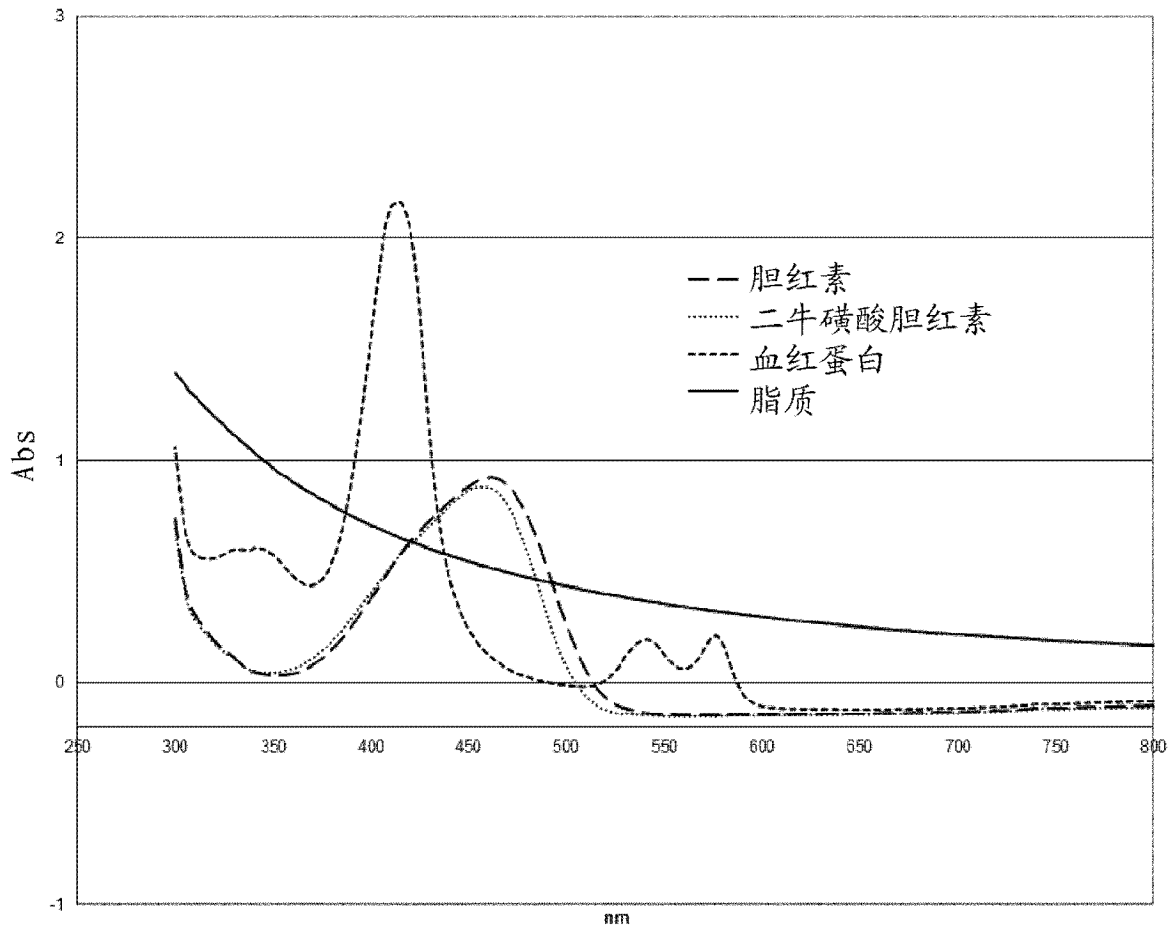


图 1

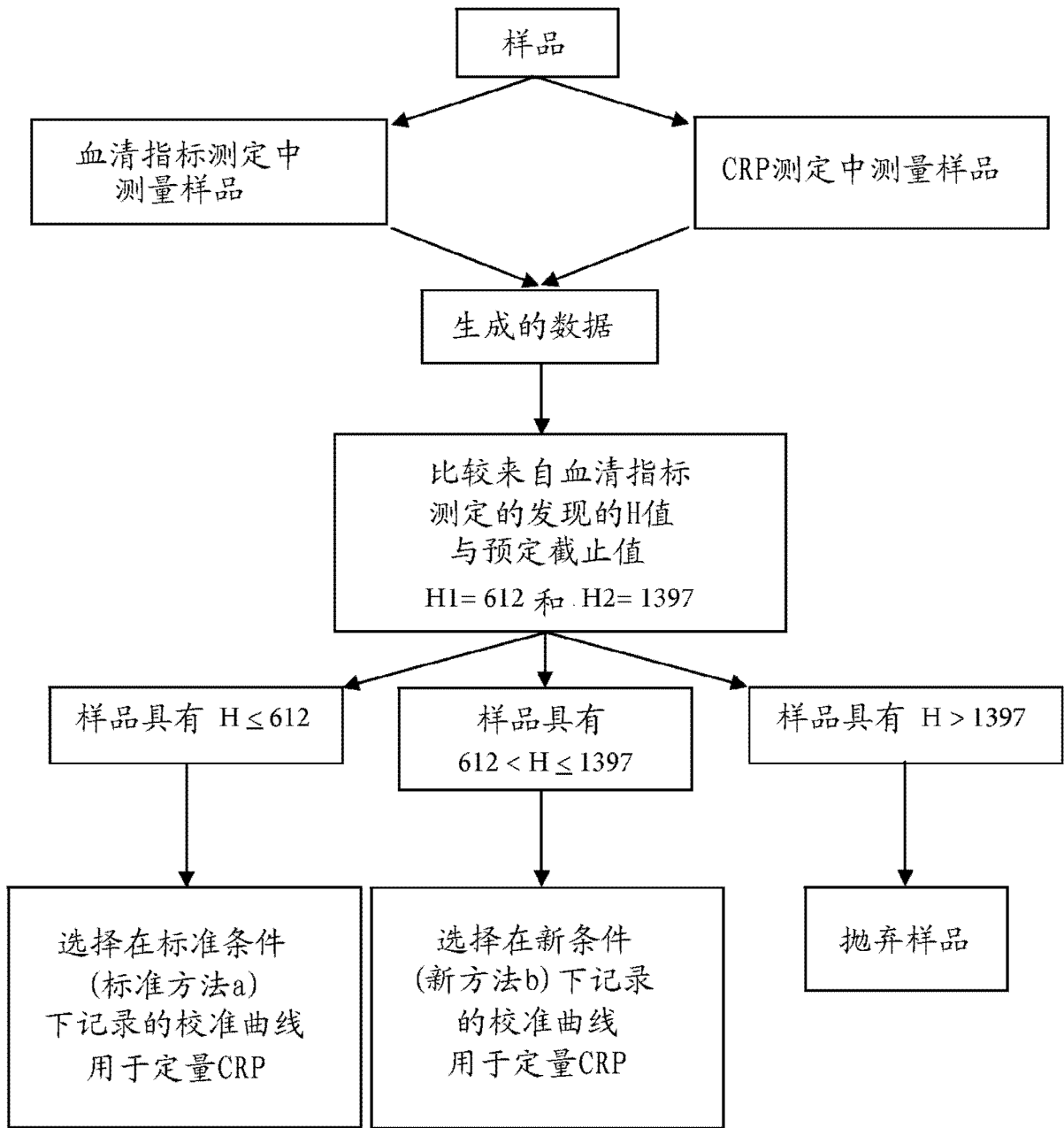


图 2

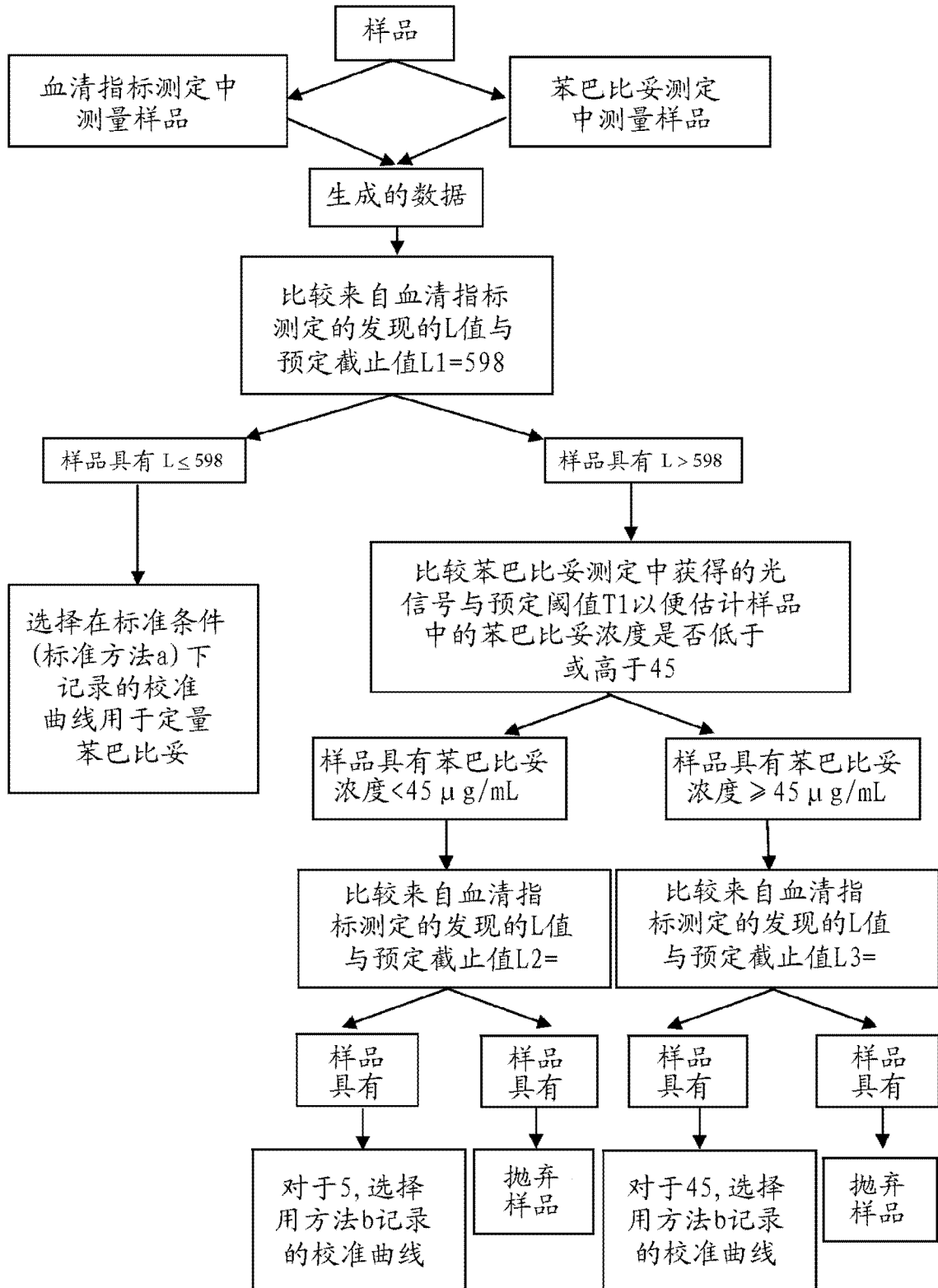


图 3