



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101680885 B

(45)授权公告日 2017.03.15

(21)申请号 200880018981.5

(22)申请日 2008.06.04

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 101680885 A

(43)申请公布日 2010.03.24

(30)优先权数据  
07011169.5 2007.06.06 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2009.12.04

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2008/004457 2008.06.04

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02008/148547 EN 2008.12.11

(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司  
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 U·科博尔德 N·德尔莫特  
C·休伯 H·冯德埃尔茨

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
代理人 刘锴 黄可峻

(51)Int.Cl.  
C07K 14/00(2006.01)  
G01N 33/50(2006.01)  
G01N 33/538(2006.01)  
B01D 15/34(2006.01)

(56)对比文件  
US 4056468 A, 1977.11.01, 全文.  
US 4647654 A, 1987.03.03, 全文.  
US 5292663 A, 1994.03.08, 全文.

审查员 丁海

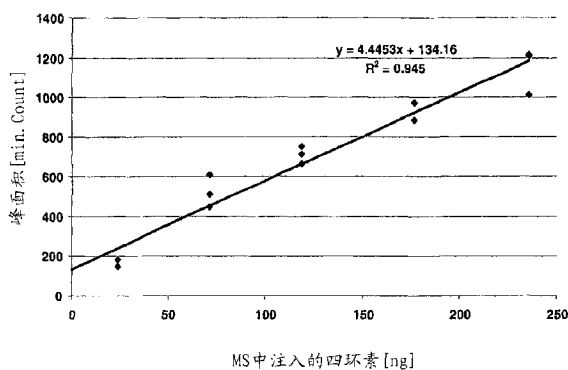
权利要求书1页 说明书18页 附图7页

## (54)发明名称

已溶血的全血样品中待分析物的检测

## (57)摘要

本发明涉及在已溶血的全血样品中检测待分析物的方法,所述方法包括将已知或者疑似含有令人感兴趣的待分析物的已溶血的全血样品施加于到含有限进色谱材料(RAM)的柱子,从而结合所述待分析物,将所述待分析物从所述RAM上洗脱并检测所述待分析物,其中,至少在第一步中使用pH高于8.0的缓冲液。优选为所述已溶血的全血样品获得自差分溶血。所述新方法确保了,尤其是在后续分析中,血红蛋白不干扰令人感兴趣的待分析物的检测。所述方法可容易地应用于例如来自自己溶血的全血样品的许多待分析物的在线检测中,例如应用于抗生素、叶酸或诸如他克莫司或西罗莫司等免疫抑制药物的检测。



1. 已溶血的全血样品中待分析物的检测方法,所述方法包括:

a) 将已知或者疑似含有令人感兴趣的待分析物的已溶血的全血样品施加于到含有限进色谱材料(RAM)的柱子,从而结合所述待分析物,

b) 从所述RAM上洗脱所述待分析物,和

c) 检测所述待分析物,

其中至少在步骤(a)使用pH为9.5-12.5的缓冲液,以及所述待分析物具有10 kDa或更小的分子量,其中,所述缓冲液的浓度为5 mM-20 mM,

其中,所述待分析物选自免疫抑制药物、滥用药物、叶酸和叶酸类维生素,

其中,所述免疫抑制药物选自环孢霉素CsA、霉酚酸酯MMF、瑞帕霉素RAPA、他克莫司FK-506、硫唑嘌呤AZA和甲基泼尼松龙MP,其中所述滥用药物选自安非他命、可卡因和可卡因代谢物、甲基安非他命、阿片剂和阿片剂衍生物、大麻素和苯环利定,

其中,所述RAM的内表面通过疏水相互作用、离子相互作用或通过极性相互作用与令人感兴趣的待分析物进行结合,

其中,所述RAM的孔径为60至120 Å。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述RAM选自多孔氧化硅或多孔聚合物基颗粒。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述多孔氧化硅或多孔聚合物基颗粒具有孔的疏水内表面,并在所述孔之外具有亲水涂层。

4. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述RAM的内表面通过疏水相互作用与令人感兴趣的待分析物进行结合,并且所述RAM的内表面为C4-、C8-或C18-基质。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其中RAM的孔径恰当地防止已溶血的血液的蛋白级分进入所述孔,所述蛋白级分包括15 kDa以及更大的多肽。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其中从RAM柱上洗脱后的待分析物再通过反相HPLC进行分离。

## 已溶血的全血样品中待分析物的检测

[0001] 本发明涉及在已溶血的全血样品中待分析物的检测方法,所述方法包括将已知或者疑似含有令人感兴趣的待分析物的已溶血的全血样品施加于到含有限进色谱材料(restricted access chromatography material (RAM))的柱子,从而结合所述待分析物,将所述待分析物从所述RAM上洗脱并检测所述待分析物,其中,至少在第一步中使用pH高于8.0的缓冲液。所述新方法确保了血红蛋白不干扰令人感兴趣的待分析物的检测。所述方法可容易地应用于例如来自已溶血的全血样品的许多待分析物的在线检测中,例如应用于抗生素、叶酸或诸如他克莫司(tacrolimus)或西罗莫司(sirolimus)等免疫抑制药物的检测。

### 背景技术

[0002] 样品中成份越多,其中所包含的目标待分析物的分析越困难。红血细胞含有非常大量的蛋白质和小分子量成份,它们对诸如全血等生物流体中令人感兴趣的待分析物的检测可能具有潜在的干扰。这是为什么在临床常规中分别使用血液血浆或简称为血浆(即抗凝全血样品;除去细胞和红细胞)或血液血清或简称为血清(即凝结全血;除去细胞、红细胞凝结体系中的大部分蛋白尤其是纤维蛋白/纤维蛋白原)的主要原因之一。例如与血清或血浆相比,全血样品液更难以处理。全血趋于更不稳定,并且红细胞的缓慢破裂将破坏相当数量的令人感兴趣的待分析物的可靠测量。

[0003] 如上所述,可以由全血获得血清或血浆并用于待分析物的检测。理论上可以通过过滤或离心从全血中除去细胞和红细胞。然而,这些方法要么不适用于常规诊断环境设置,要么它们不能进行至少部分存在于红血细胞中的那些待分析物的正确测量。

[0004] 在本领域中广泛已知的用于全血样品中待分析物的检测的绝大多数方法都要求在待分析物能够被量化之前对样品进一步的处理。在许多方法中,首先通过选择性沉淀或萃取方法从潜在干扰性物质中分离令人感兴趣的待分析物。萃取可在液相中或固相上进行。通过分别描述在一些免疫抑制药物或叶酸的检测中使用的方法能对此进行举例说明。

[0005] 广泛已知的免疫抑制药物例如有霉酚酸酯(mycophenolate mofetil) (MMF)、纳巴霉素(rapamycin) (RAPA,也称为西罗莫司(sirolimus))和他克莫司(tacrolimus) (FK-506)。免疫抑制药物的治疗性药物监测对于器官移植患者以及患有AIDS的患者尤其重要(参见,例如:Drug. Ther. Perspect. 17 (22) (2001) 8-12)。大多数进行实体器官移植的患者需要终身免疫抑制治疗以防止同种异体移植排斥。但是,因为许多免疫抑制剂具有很窄的治疗范围并且与各种毒性和潜在药物相互作用相关,因此治疗性药物监测(TDM)和患者临床评估的联合使用将是尤其重要的。

[0006] 他克莫司是首先于1994年获得美国食品和药物管理局(US Food and Drug Administration (FDA))批准的用于防止肝同种异体移植排斥的大环内酯类抗生素。于体外其效力比环孢霉素高多至100倍,并且临床上,其与组织排斥发生率的更显著降低有关。已证实他克莫司作为经受了各种移植过程的患者中的首要免疫抑制疗法,以及作为在进行肝或肾移植后出现高排急性同种异体移植排斥(refractory acute allograft rejection)的患者中的抢救疗法的疗效。治疗谷浓度(therapeutic trough concentration)为5-20 $\mu$ g/L。

[0007] 由于存在于循环中的至少部分他克莫司被隔离在红细胞中,因此在该药物的临床常规测量中使用全血样品。例如可以通过高效液相色谱(HPLC)、与质谱(MS)联用的HPLC、放射受体分析(RRA)或者通过免疫分析(IA)等检测他克莫司。后两种方法并不能利用相同的灵敏度检测他克莫司及其某些代谢物。这将导致在所采用的方法中出现干扰(Murthy, J.N. 等人, Clin. Biochem. 31 (1998) 613-617)。至少在他克莫司的各种代谢物的检测中, HPLC-MS-法可被作为黄金标准。然而,以上提到的所有方法均要求从全血中萃取他克莫司。通常,在临床常规中使用乙腈从全血中萃取他克莫司,并且似乎不存在方法能够进行全血样品中他克莫司的在线测量。

[0008] 与他克莫司相似,西罗莫司也是大环内酯抗生素。其首先于1999年获得US FDA的批准用于防止肾移植后的同种异体移植排斥,并且实际上,在与环孢霉素和皮质类固醇联合急性使用时也显示出在该方面的令人鼓舞的结果。于体外,西罗莫司的功效比环孢霉素强多至100倍,并且临床上,其表现出与环孢霉素的协同作用,也许能减少环孢霉素的剂量。治疗谷浓度为5-15 $\mu\text{g/L}$ 。

[0009] 与他克莫司类似,显著量的西罗莫司存在于红细胞中。因此,不管使用任何检测方法,均要求全血样品的萃取。在临床常规中,被怀疑含有西罗莫司的样品经HPLC并通过紫外光(UV)或串联质谱(MS/MS)进行检测。最近,还报道描述了一种微粒酶免疫分析法(Jones, K. 等人, Clinical Therapeutics 22, Suppl. B (2000) B49-B61)。

[0010] 叶酸是一组氧化态各不相同的相关分子的统称。叶酸是水溶性维生素B家族的一部分,其作为高半胱氨酸代谢的辅酶以及在DNA复制所需的单碳基团转移中起到重要作用。叶酸不足的状态与增高的神经管缺陷风险相关,与心血管疾病、贫血相关,与各种癌肿以及与阿尔茨海默病相关。血清或血浆叶酸浓度反映了最近的饮食摄入,因此红细胞叶酸浓度更能指示身体储存(Gunter, E.W. 等人, Clin. Chem. 42 (1996) 1689-1694; Fazili, Z. 等人, Clin. Chem. 51 (2005) 2318-2325; Pfeiffer, C.M. 等人, Clin. Chem. 50 (2004) 423-432)。红细胞总叶酸(红血细胞叶酸=RBC-叶酸)是全身叶酸状态的最好衡量值。最近的研究表明5-甲基四氢叶酸是循环血细胞中的主要叶酸类维生素。为了诊断叶酸不足,由于超过95%的叶酸位于血细胞中,因此推荐不仅由血清或血浆进行测量,而且也由血细胞进行测量。血细胞中的浓度能更真实地反映实际叶酸状态。

[0011] 已有诸多方法可供使用以测量在不同基质中的叶酸。主要分析方法是微生物分析、放射免疫分析、化学发光、色谱法以及质谱法。大多数方法基于叶酸与叶酸结合蛋白的竞争性结合。

[0012] 对于RBC-叶酸的测量,溶血剂的使用显然是必须的。例如,用于RBC叶酸测量的Elecsys<sup>TM</sup>分析(Elecsys是Roche Group成员的注册商标)使用抗坏血酸作为溶解剂。Elecsys RBC-叶酸溶血剂与用于定量测定血细胞中叶酸(RBC-叶酸)的Elecsys叶酸分析一起使用。经抗凝剂(肝磷脂或EDTA)处理的全血用抗坏血酸溶液(0.2%)稀释并于20-25 $^{\circ}\text{C}$ 温育大约90分钟。发生血细胞的溶解并伴随细胞内叶酸的释放。然后将溶血产物用作“预稀释”样品(与血清类似)以备用于随后Elecsys叶酸分析中的测量。在血细胞叶酸浓度的计算中对全血中测定的血细胞比容值与样品经预处理带来的稀释效应进行补偿(Greiling, H., Gressner, A.M., Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd ed., Stuttgart-New York, Schattauer (1995), pp. 460-462; Gunter, E.W. 等人, Clin. Chem. 42

(1996) 1689-1694)。

[0013] 由于其中所含有的干扰物质,经抗坏血酸处理产生的溶血产物不能用于常规色谱法。为了在色谱法或质谱测量中使用这样的溶血产物,必须在进行分析前除去细胞碎片和沉淀的蛋白质。

[0014] 通常通过离心、离线过滤或固相萃取将碎片和沉淀蛋白质从样品中除去。

[0015] 固相萃取(SPE)是广泛用于例如分析样品的预富集和净化,用于各种化学品的纯化并用于从水溶液中除去有毒或有价值的物质的色谱技术。通常利用装有适宜的树脂的柱子或药筒进行SPE。SPE已得以发展从而利用能通过疏水作用、离子交换、螯合作用、吸附作用以及其他机制与待分析物相互作用的吸附剂与待分析物相结合并将其从流体中移除。由于针对不同类别的待分析物的不同SPE应用要求不同的吸附剂,因此伴随对具有特别性质从而对令人感兴趣的待分析物或一类待分析物具有独特选择性的吸附剂也存在需求。SPE材料和SPE柱的代表性实例可分别在US 6,322,695和US 6,723,236中找到。

[0016] 由以上现有技术讨论显而易见的是,由全血中进行这些待分析物的直接,尤其是在线测量是完全不可能的,或者至少需要承受复杂和/或耗时的处理步骤所带来的麻烦。不希望受限于以下理论,但可认为由于至少两条理由:a)经溶血的全血样品通常含有聚集物或沉淀物和b)极高浓度的血红蛋白干扰检测方法,从而导致本领域中缺乏适宜的方法。

[0017] 本发明的发明人已讨论和解决了两个问题。首先,已开发了称为差分溶血(differential hemolysis)的方法,该方法例如能完全溶解全血样品中所包含的血细胞而不形成干扰性聚集物或沉淀物。差分溶血法详细描述如下。

[0018] 然而,本发明的发明人还发现在已溶血的血液样品中明显存在的高浓度血红蛋白倾向于干扰令人感兴趣的待分析物的灵敏检测。这在使用最先进的色谱材料,即所谓的限进色谱材料(RAM)时已被观察到。如果根据标准步骤将已溶血的血液样品加到含有RAM的柱子上,血红蛋白并没有完全移除,有些血红蛋白倾向于与RAM柱相结合并因此倾向于干扰分析检测。

[0019] 本发明的发明人因此面对着例如即使在差分溶血之后仍存在于已溶血的血液样品中的血红蛋白将干扰令人感兴趣的待分析物的检测的问题。本领域技术人员很容易认识到测量越敏感越精确,该问题越严重。

[0020] 然而,尤其是在低分子量待分析物的检测中,迫切需要全血能直接用作样品。这在使用液相色谱(LC)分离步骤的在线检测方法中将额外带来特别的好处。显而易见的是,例如全血中免疫抑制药物的直接在线检测将是临床常规实验室中重要的方法。

[0021] 目前,惊奇地发现并已经确认可能例如通过在已溶血的全血样品中所含有的血红蛋白有效地避免全血的干扰。已发现并详细描述如下,在特定缓冲液条件下血红蛋白不与RAM相结合,或者至少不干扰令人感兴趣的待分析物的在线检测。这些条件下,在由已溶血的全血样品进行令人感兴趣的待分析物的检测中,能以精彩的方式使用RAM。

## 发明内容

[0022] 在第一实施方式中,本发明涉及在已溶血的全血样品中检测待分析物的方法,所述方法包括将已知或者疑似含有令人感兴趣的待分析物的已溶血的全血样品施加于到含有限进色谱材料(RAM)的柱子,从而结合所述待分析物,将所述待分析物从所述RAM上洗脱

并检测所述待分析物,其中,至少在将样品施加于RAM的步骤中使用pH高于8.0的缓冲液。

[0023] 在优选实施方式中,描述了所述RAM选自多孔氧化硅(或称多孔硅胶(porous silica))或多孔聚合物基颗粒并在内表面和/或外表面上具有有益的修饰。本文所描述的方法可用于某些临床上重要的待分析物的检测。

### 具体实施方式

[0024] 本发明的方法在体外进行,即不在人体或动物体上进行。

[0025] 在优选实施方式中,本发明涉及已溶血的全血样品中待分析物的检测方法,所述方法包括步骤a)将已知或者疑似含有令人感兴趣的待分析物的已溶血的全血样品施加于到含有限进色谱材料(RAM)的柱子,从而结合所述待分析物,(b)将所述待分析物从所述RAM上洗脱,以及(c)检测所述待分析物,其中,至少在步骤(a)中使用pH高于8.0的缓冲液。

[0026] 除非上下文另外指明,本文中所使用的冠词“a”和“an”用于指代一个或一个以上(即至少一个)的所述冠词的语法上的宾语。举例说明,“令人感兴趣的待分析物”指一个令人感兴趣的待分析物或一个以上的令人感兴趣的待分析物。

[0027] 本发明的“限进材料”或“限进色谱材料”(RAM)是具孔色谱材料,所述孔具有的内表面能结合令人感兴趣的待分析物,其具有的孔径能恰当地防止已溶血的血液的蛋白级分(fraction)进入所述孔。

[0028] 原始描述的限进材料(Boos, K. S. 和Rudolphi, A., LC-GC 15 (1997) 602-611, 以及Rudolphi, A. 和Boos, K. S., LC-GC 15 (1997) 814-823)具有起到类似反向色谱材料作用的疏水内表面。基于这种RAM的色谱可被视为反相色谱和尺寸排阻色谱的结合。

[0029] 本领域技术人员已知可供使用的各种类型的RAM。

[0030] 优选为,在本发明的方法中使用的RAM选自多孔氧化硅或聚合物基颗粒。在本发明的方法中使用的RAM颗粒的其它特征在于亲水性涂层。

[0031] RAM,即RAM孔外侧的亲水性涂层优选为基于提供诸如烷基二醇等羟基基团,诸如羧甲基等羧基基团,诸如氨基丙基或二(羟基乙基)氨基乙基等氨基基团的涂层材料。还优选的是使用亲水性聚合物,诸如聚乙二醇、聚乙烯醇、寡聚糖或多糖、葡聚糖、肽或蛋白质从而使得RAM孔外侧具有亲水性。能用于本文所公开的方法中的可市售获得的优选的RAM材料的例子是Biotrap 500MS® (Chromtech, Cogleton, United Kingdom) 或LiChrosphere®RP-18ADS (Merck, Darmstadt, Germany)。

[0032] RAM的内表面能结合令人感兴趣的待分析物。在本发明的方法中所使用的RAM的内表面将经过本领域技术人员的选择以匹配令人感兴趣的待分析物的化学性质。可以通过任何适宜的相互作用,例如分子印迹、疏水相互作用、离子相互作用或极性相互作用实现所述结合。本领域技术人员完全熟知这些类型的相互作用。

[0033] 在优选实施方式中,在本发明的方法中所使用的RAM通过疏水相互作用或通过极性相互作用与令人感兴趣的待分析物相结合。

[0034] 优选为,在本发明的方法中所使用的氧化硅或聚合物基颗粒的内孔被分别选自阴离子或阳离子交换材料或选自疏水基团的基团所覆盖。

[0035] 优选为,在本文所公开的方法中所使用的氧化硅或聚合物基颗粒的内孔具有疏水涂覆的孔内表面,其中所述结合材料选自脂族基团、苯基基团、疏水肽或其他反相材料。优

选为,所述脂族基团具有4至20个C原子。还优选为,所述内表面为C4-、C8-、C12-、C16-或C18-基质。优选的材料具有C4、C8或C18的内表面涂层。

[0036] 选择孔径使得待分析物能进入孔并从而与孔的内表面,例如反相结合。理想地为,聚合性基质成分,通常为血红蛋白,尤其是血红蛋白a)由于孔径的恰当选择而被排除在孔外,b)不附着在亲水外表面上。如果这些要求得到满足,聚合物不会被RAM所保留并经孔隙体积而流过柱子。此外,由于这些聚合物不能进入孔,几乎不会发生能改变材料保留特性的表面积垢。通常,在第二柱子中进行待分析物的分离,所述第二柱子填充标准RP材料。在优选实施方式中,在本发明的方法中所使用的RAM的孔径为60至120Å,也优选为60至100Å。

[0037] RAM被认为用于在线萃取方法,其中令人感兴趣的待分析物存在于非常难的基质中。然而,所希望的并且已被证实为必要的是从已溶血的血液样品尽可能地除去蛋白质从而使这些分子对待分析物的测量的任何干扰减至最小。根据所选择的孔径,可能的是将大于某个分子量的蛋白质排除在外。优选为,被排除的蛋白质级分包括20kDa和更大的多肽。还优选的是被排除的蛋白质级分包括19kDa和更大的、18kDa和更大的、17kDa和更大的、16kDa和更大的以及15kDa和更大的多肽。

[0038] 由各自制造商给出的市售RAM材料的尺寸排阻下限介于约15至20kDa。因此,针对表观分子量为20kDa或更大的多肽,RAM起到很好的作用,分子量仅为16kDa的血红蛋白则体现了所研究的市售RAM的一个突出问题。实际上,该问题可能是为什么在临床诊断常规中仍未建立起由已溶血的血液样品进行在线色谱检测的原因之一,甚至是最重要的原因。有以下所示出的实验可以看到,如果根据标准方案使用市售RAM ADS®柱,血红蛋白非特异性地与之结合。在洗脱包括令人感兴趣的待分析物在内的被结合的材料时,血红蛋白也从RAM上释放并干扰待分析物的检测。令人惊讶的是,已发现如果将含有血红蛋白的样品施加于pH高于8.0的缓冲液,在已溶血的全血样品中含有的血红蛋白的非特异性结合将显著降低。

[0039] 于特定pH将样品“施加于”RAM并不必须意味着样品具有该pH或者被调节至该pH,但意味着该样品被注入其中的样品施加缓冲液(application buffer)具有该pH。本领域技术人员通常也将这样的缓冲液称为第一洗脱液或作为缓冲液(A)。在常规和优选模式的液相色谱中,RAM柱通常用施加缓冲液进行平衡,而系统正在运行,即,施加缓冲液流经色谱装置并将样品注入到缓冲液流中。这就是为什么施加缓冲液也被称为洗脱液,例如称为洗脱剂(A)。本领域技术人员将理解施加缓冲液的缓冲容量将经过选择从而匹配样品的缓冲强度。在溶血产物的情况下,所述缓冲液的摩尔浓度能低至5mM。优选为,于约10或约20mM的浓度使用所述缓冲液。如文,本领域技术人员可容易地选择缓冲强度以满足要求。

[0040] 在高于8.0的pH下,血红蛋白与RAM的非特异性结合消失或者降低至不会干扰令人感兴趣的待分析物的检测的水平。优选为,用于将样品施加至RAM的缓冲液的pH至少为pH 8.5或更高,或者优先为至少pH 9.0或更高,或者pH 9.5或更高。pH范围的上限值可恰当地进行选择。本领域技术人员将选择既不破坏令人感兴趣的待分析物也不破坏所使用的RAM的pH。优选为,上限的pH为pH 12.5或更低。也优选为pH 12.0或更低,或pH 11.5或更低,或pH 11.0或更低。

[0041] 在优异的优选的在线设备中,在适当的缓冲条件下将样品施加于RAM,并用适当的冲洗缓冲液洗涤RAM。通过调节系统的阀门和流向,待分析物如果存在则被洗脱而出,流过分析柱并被检测。在另一优选实施方式中,通过对施加和洗脱缓冲液使用相同的pH而实施

本发明的方法。正如本领域技术人员所知,可调节令人感兴趣的待分析物的洗脱从而满足最适合于被研究的待分析物的条件。在许多情况下,梯度洗脱将满足要求。

[0042] 本发明的待分析物可以是任何无机或有机分子,包括生物分子,但不包括核酸分子。所述待分析物将不是核酸,尤其不会是DNA。优选为,所述待分析物选自多肽、碳水化合物和无机或有机药物分子。优选为,所述令人感兴趣的待分析物具有10kDa或以下,还优选为9kDa或以下、8kDa或以下、7kDa或以下、6kDa或以下或5kDa或以下的分子量。

[0043] 多肽或蛋白质是本质上由氨基酸构成并且具有由肽键相连的至少两个氨基酸。在此处所公开的方法中被研究的令人感兴趣的待分析物的情况下,所述多肽优选为由至少3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25和30个至多至约100个氨基酸构成。优选所述肽含有5至100个,还优选为由10至40个氨基酸。合适的令人感兴趣的肽待分析物例如是在循环中存在的肽荷尔蒙和其他肽,尤其是利用本发明的膜溶解剂进行处理的红血细胞所释放而出的多肽。

[0044] 优选为本发明的方法用于全血样品中待分析物的在线检测,其中所述待分析物至少部分地位于红血细胞中,诸如西罗莫司、他克莫司或叶酸。

[0045] 本发明的优选目标待分析物选自滥用药物和免疫抑制药物。

[0046] 优选的目标待分析物是滥用药物。滥用药物选自安非他命、可卡因和可卡因代谢物例如苯甲酰芽子碱(benzoylcegnonine)、甲基安非他命、阿片剂(opiate)和阿片剂衍生物、大麻素例如四氢大麻醇和苯环利定。

[0047] 另一优选的目标待分析物是免疫抑制药物。所述免疫抑制药物优选地选自环孢霉素(CsA)、霉酚酸酯(MMF)、瑞帕霉素(RAPA也称为西罗莫司)、他克莫司(FK-506)、硫唑嘌呤(AZA)和甲基泼尼松龙(MP)。

[0048] 另一优选的目标待分析物分别是叶酸或叶酸类维生素。一种优选的待分析物是同时在血浆和红血细胞中含有的总叶酸。

[0049] 在本发明的方法中,令人感兴趣的待分析物首先在适宜地条件下与RAM相结合。为进行检测和/或量化,所述待分析物从RAM上洗脱并随后经过合适的方法进行检测或量化。优选为,所述令人感兴趣的待分析物首先从RAM上洗脱,然后经液相色谱的协助而分离。优选为从RAM上洗脱的物质经过反相HPLC进行进一步的分离。

[0050] 液相色谱(LC)是非常重要的分析技术,其用于令人感兴趣的待分析物的分离、鉴定和量化,即使待分析物存在于不同样品成分的复杂混合物中。在进行LC时,混合物中的化学成分通过液体流动相的流动被载送经过由合适的固定相填充的柱子。所述固定相通常是不规则的或者球形的颗粒,具有适合与待分析物可逆地进行相互作用的表面。所述颗粒可以是多孔的以增大可供进行相互作用的表面面积。通过待分析物与流动相和固定相的相互作用之间的差异实现在液相色谱中的分离。本领域技术人员将充分理解,应当选择对进行研究的待分析物而言均合适的固定相和流动相。此外,使用者也将确定出色谱条件适合于在样品移动经过固定相至检测器时保持待分析物带尖锐。

[0051] 高效液相色谱,也称为高压液相色谱,简称为HPLC是特殊形式的液相色谱,并且当前在生物化学和分析化学中频繁使用。与LC相比,固定相的粒径更小,根据现有理论,这将导致更小的带扩散并使所得的色谱图中的峰更窄,由此得到更好的分辨率和灵敏度。由于更小的粒径,HPLC应用中的流动相不得不在高压下受驱动流经柱子。

[0052] 流动相经选择以确保样品溶质的溶解度。对于固定相,优选为使用微粒氧化硅(无覆盖的或者经化学修饰的),这是因为其高表面面积使溶质-固定相相互作用之间的差异更加明显。相对于溶质流动相相互作用而言,与溶质相互作用更强的固定相的使用将导致非常长的保留时间,该状况没有任何分析用途。因此,固定相必须经选择从而提供相对于流动相中的溶质相互作用而言较弱至适中的溶质相互作用。结果,溶质的属性决定了所选择的LC类型。在流动相中应当发生更强的相互作用以确保样品的溶解性并以备于进行洗脱,同时固定相应当对溶质间的更细微的差别敏感。例如,通常使用极性流动相和能分辨溶质的色散特性间的细微差异的非极性固定相对极性中性化合物进行更好的分析。HPLC的强效的一方面在于流动相可以千变万化以改变保留机制。可将修饰剂加入到流动相中以调整保留。例如,pH是水性流动相中的重要变量。

[0053] 可以划分五类一般类型的LC:

[0054] 1. 正相色谱,规定为使用极性固定相和非极性(色散)流动相。

[0055] 2. 反相色谱,则是相反的可能性,规定为非极性固定相和极性流动相(由一种或多种极性溶剂,例如水、甲醇、乙腈和四氢呋喃构成)。

[0056] 3. 涉及离子相互作用的离子交换色谱。在此情况下,流动相必须支持离子化以确保离子溶质的溶解性。固定相也必须部分离子化以促进保留。

[0057] 4. 尺寸排阻色谱涉及仅依据分子尺寸的分选,并且理想地要求溶质与固定相没有吸附相互作用。

[0058] 5. 亲和色谱基于例如特定结合配对,诸如抗体和相应的抗体或受体与相应的配体之间的特定的相互作用。例如,结合配对的第一搭档与适宜的固定相结合并用于俘获所述结合配对的第二搭档。第二搭档可通过适宜的手段释放和分离。

[0059] 以上给出的分离原理的一般分类并非穷举,因此是非限制性的,还有可用于液体样品分离的其他分离原理,例如疏水相互作用色谱、亲水相互作用色谱、离子对反相色谱、分子印迹材料类分离。

[0060] 可通过任何适宜的方法进行令人感兴趣的待分析物的表征和/或量化。合适的优选检测器感知流经的化合物的存在,并提供电子信号至记录器或计算机数据站。输出通常是以色谱图的形式,通常在某个峰里发现令人感兴趣的物质。峰面积或峰高度可用于量化在所研究的样品中存在的待分析物的数量。

[0061] HPLC系统用检测器是能根据所洗脱的样品化合物发出响应并随后在色谱图上标出峰。所述检测器紧接着流动相放置以在化合物从柱子上洗脱后对其进行检测。本领域技术人员可利用粗糙的和细微的调节控制对峰的宽度和高度进行调整,并且也可调整控制检测和灵敏度参数。有许多种类的检测器可与HPLC一同使用。一些更常见的检测器包括:折射率(RI)、紫外(UV)、荧光、放射化学、电化学、近红外(近-IR)、质谱(MS)、核磁共振(NMR)和光散射(LS)。

[0062] 折射率(RI)检测器测量样品分子弯曲或折射光线的能力。每种分子或化合物的这种性质称之为其折射率。对于大多数RI检测器,光线经过双模块流动池至光检测器。流动池的一路通道导向流经柱子的流动相,而另一路仅导向流动相。当光线因为从柱子中洗脱而出的样品而弯曲是进行检测,读数为两路通道之间的差异。

[0063] 荧光检测器测量化合物吸收光线并在不同波长上发射光线的的能力。每种化合物具

有特征性的荧光。激发光经过流动池，而单色仪和光检测器测量发射光强度。

[0064] 放射化学检测涉及放射性标记物质，通常为氚 ( $^3\text{H}$ ) 或碳-14 ( $^{14}\text{C}$ ) 的使用。其通过与  $\beta$  粒子电离作用相关的荧光检测而进行，在代谢研究中最流行。

[0065] 电化学检测器测量能进行氧化或还原反应的化合物。这通常通过测量迁移样品经过存在给定电势差的电极之间时其获得或丢失的电子而实现。

[0066] 质谱是用于测量离子的质荷比 ( $m/z$  (或  $m/q$ )) 的分析技术。其最常用于通过形成代表样品成分的质量的质谱图从而分析物理样品的组成。该技术具有多种用途，包括：通过化合物和/或化合物片段的质量鉴定未知化合物；确定化合物中一种或多种元素的同位素组成；通过观察化合物的分裂确定化合物的结构；采用认真设计的方法量化样品中的化合物的量 (质谱本身不具有量化性)；研究气相离子化学 (真空中离子和中性物质的化学)；结合各种其他方法确定化合物的物理、化学或者甚至生物性质。

[0067] 质谱仪是用于质谱的装置，并且生成样品的质谱图以分析其组成。这通常通过离子化样品成分、分离不同质量 ( $m/z$  比) 的离子并通过测量离子流的强度记录它们的相对丰度而完成。典型的质谱仪包括三部分：离子源、质量分析器和检测器。

[0068] 离子源的类型是强烈影响质谱能分析何种类型的样品的主要因素。电子离子化和化学离子化用于气体和蒸汽。在化学离子化源中，通过源中碰撞时发生的化学离子-分子相互作用将待分析物离子化。经常用于液体和固体生物样品的两种技术包括电喷雾离子化 (ESI) 和基质辅助激光解吸/离子化 (MALDI)。其他技术包括快原子轰击 (FAB)、热喷雾、气压化学离子化 (APCI)、第二离子质谱 (SIMS) 和热离子化。

[0069] 在优选实施方式中，在本发明的方法中待分析物的检测通过质谱进行。

[0070] 核磁共振 (NMR) 检测是基于某些具有奇数质量的原子化例如  $\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  以随机方式绕轴旋转的事实。然而，当置于强磁体的极点之间时，旋转则与磁场平行或反平行排列对齐，由于平行取向的能量略低，因此更优选平行取向。然后用电磁辐射辐照原子核并被吸收从而使原子核处于更高能量态；结果，它们现在与辐射“共振”。每个  $\text{H}$  或  $\text{C}$  将根据其在化合物中的位置以及相邻原子或原子团而产生不同的图谱，这是因为分子中的所有原子核被电子云包围，电子云改变了围绕的磁场从而改变了吸收频率。

[0071] 当源发射出平行光线撞击溶液中的颗粒，一些光被反射、吸收、透射或散射。这些现象可被光散射 (LS) 检测器所测量。LS 检测最主要的形式称之为比浊法 (nephelometry) 和浊度测量法 (turbidimetry)。比浊法定义为颗粒溶液所散射的光的测量。该方法使之能检测以诸多角度散射的光部分。浊度测量法定义为由于溶液中的离子而导致的透射光的减少的测量。其测量光散射作为透射过粒子溶液的光线减少。因此，它能量化剩余的透射光。

[0072] 近红外检测器通过于 700 至 1100nm 的光谱范围内扫描化合物而进行。在特定波长下检测每种分子中特定化学键的拉伸振动和弯曲振动。

[0073] 本文所描述的方法可用于已溶血的全血样品中待分析物的检测。对于本领域技术人员显而易见的是，本发明的方法也适用于其他基础样品物质诸如血浆、血清、尿液或 CSF。在本发明的方法中使用的优选样品因此选自血浆、血清、尿液、CSF 和已溶血的全血。优选已溶血的全血样品。

[0074] 如上所述，本发明的作者也发现了差分溶血的方法。该方法并未对公众公开并因此将在以下详细描述。术语差分溶血涉及在适合于溶解红血细胞的细胞膜而同时不引起样

品成分沉淀的条件下处理样品的方法,所述样品包括血细胞和膜溶解剂。由以下描述显而易见的是,本发明的方法优选为利用经差分溶血的全血样品而实施。

[0075] “红血细胞”在本发明中的意义是指没有细胞核的红血细胞。这些没有细胞核的红血细胞例如是在哺乳动物循环中发现的成熟红血细胞。本发明不涉及例如在禽类物种中发现的有核红血细胞。后者将满足有核或真核细胞的标准。

[0076] 用于本发明的目的的“哺乳动物”涉及划分为哺乳动物的任何动物,包括人类、家养或畜养动物,以及动物园圈养动物、体育运动用动物或宠养动物,例如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊和兔子等。优选为所述哺乳动物是人类。

[0077] “真核细胞”或“有核细胞”在本发明中的意义是指由真核生物体获得的并具有其细胞核的细胞。真核细胞的例子是由有核组织、有核组织培养细胞和有核血细胞获得的细胞。在优选实施方式中,所述真核细胞是有核血细胞,例如凝血细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或白细胞。来自低级生物体诸如细菌的细胞虽然含有基因物质,但不是真核细胞。

[0078] 可以通过本领域中已知的任何溶血方法进行全血样品的溶血。优选为,通过差分溶血得到所述已溶血的全血样品。通过使用全血样品已确定了差分溶血的有利特性,差分溶血即在适合于溶解红血细胞的细胞膜并同时不导致样品成分沉淀的条件下用膜溶解剂处理液体样品,在实施例部分进行了描述。

[0079] 优选为,经过利用合适的膜溶解剂的差分溶血处理的液体样品包含红血细胞,并且可包含有核细胞。更优选的是,所述液体样品同时包含红血细胞和有核细胞。优选为,在经差分溶血处理的方法中使用,并随后在本发明的方法中使用的液体样品是全血样品。可以理解的是,全血样品含有不具有核的红血细胞以及有核血细胞。

[0080] 优选为,所述全血样品经直接处理,即直接在取样后对其进行差分溶血处理。还优选的是,用合适的抗凝血剂收集/处理全血样品从而形成抗凝血全血样品。在临床分析常规中频繁使用的已知抗凝血剂是肝素、柠檬酸盐和EDTA。优选为,本发明的样品是抗凝血全血样品,尤其是已经过差分溶血的经柠檬酸盐处理过的全血样品或经EDTA抗凝血处理过的全血样品。

[0081] 在差分溶血方法中,液体样品以满足以下两个条件的方式进行处理:a) 如果存在红血细胞,红血细胞的膜将被破坏和b) 同时没有导致样品成分的沉淀。如所述,该方法被命名为差分溶血。在对全血样品实施所述方法时,得到经过处理的样品,即经过差分溶血处理的全血样品,其含有已溶解的红血细胞且同时没有沉淀。

[0082] 通过在合适的条件下施加适宜的膜溶解剂,对于将红血细胞的内容物与血浆隔离开来而言至关重要的细胞膜的完整性被破坏。红细胞(例如红血球,以及一些令人感兴趣的待分析物)的内容物释放到周围液体中。同时,没有导致样品成分的沉淀。

[0083] 本领域技术人员将理解,可能干扰后续分析的样品成分可具体为DNA和蛋白。只要真核细胞例如淋巴细胞或单核细胞没有被破坏,就没有DNA从这些细胞核中被释放。只要没有蛋白质沉淀,在经过差分溶血处理的样品中所包含的蛋白质就不会干扰,至少不会到干扰常规色谱步骤的程度。然而,如上进一步的描述,RBC成分,尤其是红血球可能仍然干扰令人感兴趣的待分析物的检测。

[0084] 可例如通过合适的生物用染色(life stain)容易地评估红血细胞的完整性。在本

发明的优选实施方式中,使用台盼蓝以评估红血细胞膜的完整性。完整的红血细胞不会积聚台盼蓝,而膜破裂的红血细胞则被台盼蓝染色。在将样品用台盼蓝染色以后,可以在显微镜下容易地评估红血细胞的膜完整性。可以通过对处理前后的完整红血细胞进行计数,然后将前一个数除以后一个数(dividing the first number by the latter number),将该数值乘以100从而得到破裂红血细胞的百分数。已经被溶解的红血细胞被称为已溶血的红血细胞或成为已溶血的红细胞。

[0085] 恰当的处理将足以溶解红血细胞,但同时将不会导致样品成分沉淀。所期望的是在本领域的方法中恰当的溶血处理也将影响真核细胞的外膜。然而,务必小心谨慎确保在细胞核中含有的DNA不会被释放到样品中。所使用的溶血试剂和条件或者优选为保持核膜完整因而保持核宏观上完整,或者至少DNA不会从其周围环境和DNA稳定核蛋白中释放而出。如果DNA被明显程度地释放,这些DNA可能或者甚至将感染样品的进一步处理。被释放的DNA例如倾向于使得液体非常粘稠。从而再不可能用移液管吸取或转移该样品或者使其通过某些过滤器或柱子。

[0086] 务必小心谨慎确保不会发生蛋白沉淀。本领域技术人员将理解,在生物样品,例如全血样品中存在许多不同的蛋白。所有这些蛋白具有各自独特的性质影响着它们沉淀或聚集的趋势。

[0087] 现在已发现,对以下情形进行描述和定义是可能的,所述情形是用膜溶解剂处理样品是否在合适的条件下,即以一方面溶解红血细胞的细胞膜且同时不导致样品成分沉淀的模式进行。未溶解的红血细胞和沉淀的样品成分将对该样品的性质产生负面影响。

[0088] 差分溶血的条件是否合适可容易地并有限地通过采用以下标准步骤进行判定:将血球容积为40的全血样品用候选溶血试剂进行1:10的稀释。能实现差分溶血的试剂的效果可视觉观察到。在红细胞溶解时,混合物变得清澈。如果出现样品成分沉淀,样品将变得混浊或粘稠或者二者同时发生。

[0089] 如上所述,在本发明的差分溶血的方法中使用的条件可容易地从视觉上进行评估。如果全血样品与合适的候选差分溶血用试剂一起温育,使红血细胞溶血所需的最小浓度可被认可为使混浊的血液样品透明或清澈的最低浓度。最高可能浓度则是仍能导致透明和非粘稠样品的浓度。

[0090] 已证实,确定候选溶血试剂的恰当的最小终浓度为导致经处理的全血样品的透明度变化的浓度是相当容易的。透明度的变化与该经过处理的样品用于HPLC直接分析的适用性很好地相关。然而,由于定义模糊,优选为通过以下描述的HPLC法确定溶血试剂的最小浓度。

[0091] 溶血试剂的最大可能浓度是仍然不会导致DNA释放和/或蛋白沉淀的浓度。样品因此将变粘稠或混浊或二者同时出现,并将不在适合直接HPLC应用。尽管可以视觉上观察粘度和浊度,但优选利用如下所述的HPLC法确定溶血试剂的最大浓度。

[0092] 同时,全血样品仍含有太多的未溶解的红血细胞,以及含有已沉淀的样品成分的经处理的全血样品将不适用于任何色谱法。这就是为什么优选为通过以标准化方式将已用候选差分溶血用试剂处理过的全血施加于HPLC柱子从而确定适合进行差分溶血的恰当条件。

[0093] 通过重复50次将10 $\mu$ l的已处理过的全血样品施加于HPLC柱子对不完全的溶血和/

或样品成分沉淀进行评估。为了评估候选的差分溶血用溶血试剂是否合适,将所述溶血试剂与全血样品相混合。优选为,使用已经在生理盐水中以1:10进行预先稀释的血球容积为40的EDTA-血液。将其以1:1的比率与候选溶血试剂相混合,混合物在20℃温育30分钟。将50等分试样的10 $\mu$ l该混合物,即已处理的全血样品施加于直径为2mm,孔径为0.5 $\mu$ m的过滤器,所述过滤器为HPLC系统的一部分。在筛板(fr it)是HPLC柱子的一部分的情况下,必须选择固定相使之不引起任何干扰或阻塞。监测背压。导致背压增加20bar以上(如果将第50次注射的背压与第一次注射的背压进行相互比较)的候选的差分溶血用试剂将被视为不合适。此方法将容易地鉴别出合适的差分溶血用试剂的最小和最大终浓度。

[0094] 优选为在上述候选差分溶血用试剂的评估中使用的过滤器是HPLC筛板。还优选的是所述筛板是长度为20mm的HPLC柱子的一部分,所述HPLC柱子填满孔径为100Å的3.5 $\mu$ m Symmetry®C18颗粒作为床材料,并且具有2mm的柱内径。

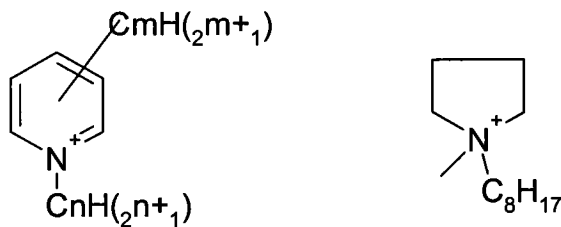
[0095] 本领域技术人员容易理解,用于该评估的全血样品获得自健康个体,即未患有已知疾病并且生物化学值处于正常范围的个体。

[0096] 已发现并确定的是,对于相当多的化学品能确定适当的条件从而满足差分溶血的两个要求。差分溶血用试剂包括合适浓度的膜溶(=膜溶解)化学品,在与样品混合后将导致差分溶血。

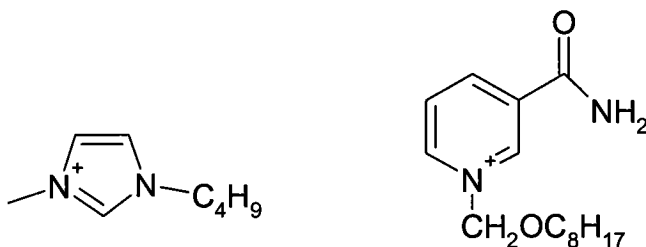
[0097] 本发明的膜溶解剂优选为以水作为溶剂,包含能实现上述差分溶血的化学品或试剂,并且还优选为可包含缓冲剂和/或防腐剂。用于差分溶血的试剂优选为基于分子量小于1000道尔顿的具有膜溶解活性的化学品或试剂。

[0098] 所述膜溶解剂优选为基于一种或多种以下化学品的膜溶作用:KBr;KJ;和KSCN或者基于由一种或多种以下阳离子和阴离子构成的盐:

[0099] 所述阳离子优选为选自:



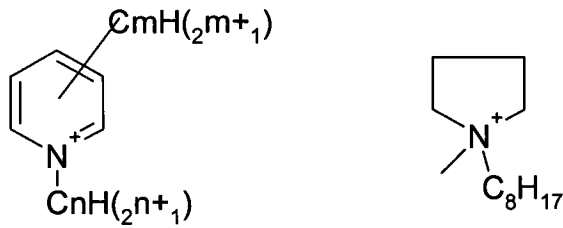
[0100]



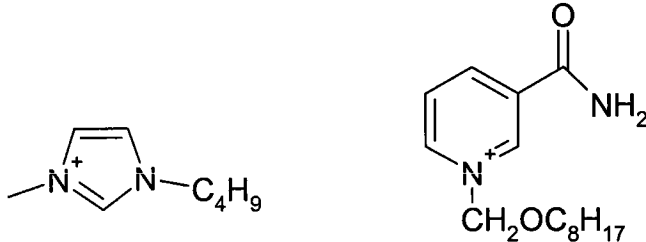
[0101] 其中m是0或1,且n是4或6。

[0102] 所述阴离子优选选自氯离子、四氟硼酸根、辛基硫酸根、碘离子和硫代氰酸根。也可能的是使用上述化学品的混合物。本领域技术人员将理解的是,正是这些化学品促进了差分溶血,因此溶血试剂的其他成分可用于不同目的,例如起到缓冲剂或防腐剂的作用。

[0103] 优选为,所述化学品在差分溶血用试剂中所含有的化学品是盐,其中所述阳离子优选为选自



[0104]



[0105] 其中m是0或1,且n是4或6,其中所述阴离子优选为选自氯离子、四氟硼酸根、辛基硫酸根、碘离子和硫代氰酸根。

[0106] 在膜溶解剂中所包含的适宜的膜溶化学品优选为选自四氟硼酸1-丁基-4-甲基吡啶盐;四氟硼酸1-丁基-3-甲基-咪唑鎓盐;辛基硫酸1-丁基-3-甲基-咪唑鎓盐;氯化1-丁基-3-甲基-吡啶盐;氯化1-己基吡啶盐;氯化1-甲基-1-辛基吡咯烷盐;氯化N-辛基吡啶盐;氯化3-氨基甲酰基-1-辛基氧基甲基吡啶盐;KBr;KJ和KSCN,以及它们的组合。

[0107] 优选为在膜溶解剂中所包含的膜溶化学品选自四氟硼酸1-丁基-4-甲基吡啶盐;四氟硼酸1-丁基-3-甲基-咪唑鎓盐;辛基硫酸1-丁基-3-甲基-咪唑鎓盐;氯化1-丁基-3-甲基-吡啶盐;氯化1-己基吡啶盐;氯化1-甲基-1-辛基吡咯烷盐;氯化N-辛基吡啶盐和氯化3-氨基甲酰基-1-辛基氧基甲基吡啶盐。更优选为使用这些试剂和KSCN的混合物。

[0108] 对于本领域技术人员显而易见的是,一旦在上述确定的基于全血样品于候选溶血剂中的1:20稀释液的方法中鉴定出候选差分溶血用试剂的适宜浓度,按需要也能使用另一比例的全血样品和经调整的溶血剂。

[0109] 在被研究的血液样品中令人感兴趣的待分析物预计为很高浓度时,溶血剂的最终浓度可以与上述设置中的相同,并且可以使用更低的全血-溶血剂之比,例如1:30、1:40或1:50。优选为在本发明的膜溶解剂中以上述确定的足以实现差分溶血的最小浓度使用差分溶血用试剂。

[0110] 在令人感兴趣的待分析物以相当低的浓度存在时,可能必要的是不将全血样品稀释1:20,而是更小。这可通过相应地调整溶血剂的浓度而轻易地实现,从而使得在溶血剂和全血样品的混合物中的溶血剂与全血的最终相对浓度保持在分别根据所必须的最小和最大的溶血剂浓度确定的比率之间,所述必须的最小和最大的溶血剂浓度在上述评估中得以确定。

[0111] 通过实施例的方式:已发现如果分别以在本发明的膜溶解剂中的1%和0.4%的浓度进行使用,氯化1-甲基-1-辛基吡咯烷盐/KSCN适用于实现所希望的结果,即最终稀释为1:20的全血样品的差分溶血。如果该溶血剂的浓度分别针对氯化1-甲基-1-辛基吡咯烷盐调整至2%,针对KSCN调整为0.8%,则经处理的血液样品中待分析物的稀释可被减小。如果随后与1:5稀释的全血样品以1:1相混合,含有该经调整浓度的溶血剂的膜溶解剂也将导致全血样品的差分溶血。由于全血与溶血剂的比率保持恒定,该经处理的血液样品仅稀释1:10。

如果分别含有10%的氯化1-甲基-1-辛基吡咯烷盐和4%的KSCN的1ml膜溶解剂与在PBS以1:1进行稀释的1ml全血相混合,也观察到差分溶血。另外一种方式,1ml全血可以加入到分别含有10%的氯化1-甲基-1-辛基吡咯烷盐和4%的KSCN的2ml膜溶解剂中。

[0112] 对于许多常规应用,期望的是全血样品与膜溶解剂的理想比率为10:1和1:20之间。优选为在本发明的方法中,全血样品与溶血剂以5比1至1比15的比率相混合。更优选为所述比率为2比1至1比10,还优选为1比1至1比5。在临床常规中使用的经调整的溶血剂的最终的一即最高可能浓度将取决于该试剂的溶解度以及价格。

[0113] 优选为,合适的差分溶血用试剂的进一步特征在于破裂红血细胞的膜所需的(最小)浓度和针对所述化学品耐受的(最高)浓度(在该浓度下同时不会导致样品成分沉淀)相差至少两倍。引起差分溶血的试剂的最小和最大浓度之间的窗口越大,该试剂在临床诊断常规中更容易地被使用。

[0114] 还优选的是在差分溶血用试剂中所包含的膜溶化学品以以下浓度使用,即在将所述试剂与样品混合后,该膜溶化学品的最终浓度对应于平均值加上最小浓度的30%减去最大浓度的30% (the final concentration of this membranolytic chemical corresponds to the mean value plus 30% of the minimal concentration minus 30% the maximal concentration, respectively)。还优选的是在差分溶血用试剂中所包含的膜溶化学品的浓度可经过调整从而使得在将其与样品混合后,其浓度在最小和最大浓度的平均值的正负25%、20%或15%之间。

[0115] 还优选的是在差分溶血用试剂中所包含的膜溶化学品以以下浓度使用,即在将样品混合后,得到对应于最小浓度的一至四倍之间的,还优选为最小浓度的1.5倍至3倍之间的浓度的该溶血化学品的最终浓度,所述最小浓度如上述确定。

[0116] 优选为,在本发明的膜溶解剂中的差分溶血用试剂以不超过75%重量/体积,还优选为不超过50%重量/体积的浓度进行使用。

[0117] 优选为,将样品进行差分溶血的方法与本发明的方法组合使用。优选为所述方法也采用另一液相色谱(LC)步骤。

[0118] 在另一优选实施方式中,本发明涉及检测液体样品中待分析物的方法,所述方法包括以下步骤,获得液体样品,通过膜溶解剂对所述液体样品进行样品处理方法,其中所述溶解剂适用于破裂红血细胞的膜,并且按要求不破坏真核细胞的细胞核,将pH调节至大于pH8.0的值,将样品施加于RAM,然后洗脱结合的物质,将其进行液相色谱并通过适宜的方法分析处于研究之中的待分析物。优选为,将样品施加于RAM,洗脱样品并进行色谱分离的步骤以及分析方法均直接(在线)进行。

[0119] 在常规应用中,固定相,即所谓的床材料,例如在RP-HPLC应用中的衍生氧化硅颗粒填充在合适的柱子中,并且被筛板所保护。筛板材料通常经选择具有比床材料的孔径更小的孔径。

[0120] 在HPLC法中,固定相颗粒的直径通常为1至10 $\mu\text{m}$ 。这些小颗粒使得必须在HPLC中使用高压。床材料通常受筛板保护。典型的筛板具有1 $\mu\text{m}$ 、0.45 $\mu\text{m}$ 或0.2 $\mu\text{m}$ 的孔径。颗粒越小,筛板的孔径通常也越小。如果样品包含能阻塞HPLC筛板的成分,这对于任何常规分析而言都是有害的。全血样品以及含有样品成分沉淀的“过度处理的”全血样品导致任何常规HPLC筛板或柱子的快速阻塞。本领域技术人员将理解,筛板孔径越小,固定相颗粒的直径越小以及

柱直径越小,在HPLC柱子中使用的筛板的阻塞出现得越快。在没有适当选择筛板的情况下,即过大的孔径,则柱材料的粒径也有关系,颗粒越小,柱子本身也将更快速地被阻塞。

[0121] 通过对样品,例如对全血样品进行差分溶血,可能的是将如此经过处理的样品直接施加到HPLC柱子上,而没有阻塞柱子的危险。优选为,在该HPLC步骤中使用的固定相颗粒直径为1至10 $\mu\text{m}$ ,还优选为2至7 $\mu\text{m}$ 。优选为在该HPLC步骤中使用的筛板具有0.5 $\mu\text{m}$ 的孔径,或还优选为0.2 $\mu\text{m}$ 的孔径。

[0122] 正如在实施例中所述,现在可行的是对样品,例如全血进行差分溶血,在其中特定pH要求得到满足的条件下,将该溶血产物施加于RAM,将RAM-结合得材料洗脱并检测诸如抗生素或免疫抑制药物例如他克莫司或纳巴霉素等令人感兴趣的待分析物的缺乏、存在或数量。

[0123] 提供以下实施例和附图以助于理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求书中得以阐述。应当理解的是可以在未背离本发明的精神的情况下在所阐述的方法中进行修改。

### 附图说明

[0124] 图1 pH 6.6:于396nm的血红蛋白色谱。峰#1表示在穿流(flow-through)中的血红蛋白,峰#2表示以15%缓冲液B洗脱的血红蛋白以及峰#3表示一旦用100%缓冲液B清洗柱子所发现的血红蛋白。

[0125] 图2 pH 10.7:于396nm的血红蛋白色谱。峰#1表示在穿流中的血红蛋白,峰#2表示以20%缓冲液(B)洗脱的血红蛋白。

[0126] 图3于pH10.7的血红蛋白的遗留的研究。通过在含有血红素的样品的分析后进行空白注射来研究血红蛋白的遗留。由色谱图可以看到,在20%缓冲液(B)中未鉴别出血红素。

[0127] 图4用于从溶血产物中提取待分析物的试验装置。在Biotrap 500后用UV-Vis检测器监测血红蛋白。在分析柱之后利用色谱检测待分析物。

[0128] 图5全血溶血产物的注射。色谱显示在四环素应当洗脱而出的位置处并没有发现峰。

[0129] 图6掺入(spike)四环素的全血溶血产物的注射。色谱显示在四环素应当洗脱而出的位置发现清晰的该待分析物的峰。

[0130] 图7在溶血产物作为样品注射后,在Biotrap 500MS上进行的空白色谱。由此色谱显而易见的是未能检测到血红蛋白。

[0131] 图8掺入到人类全血溶血产物中的四环素的校准曲线。由该图中显示的外推线以及计算所得的高相关系数( $r^2=0.945$ )证实,观察到线性相关。

[0132] 图9用于从全血溶血产物中提取并检测免疫抑制药物的分析HPLC装置。

[0133] 图10利用在线SPE-HPLC-UV由全血溶血产物提取他克莫司。绘制了于291nm(他克莫司的最大吸收)获取的色谱图。箭头指示了对应于他克莫司的峰。

[0134] 图11利用在线SPE-HPLC-UV由全血溶血产物提取纳巴霉素。绘制了于278nm(纳巴霉素的吸收)获取的色谱图。箭头指示了对应于纳巴霉素的峰。

[0135] 实施例

[0136] 实施例1

[0137] 不同pH值下各种RAM的评估

[0138] RAM柱子直接安装到分析HPLC系统中。注射入10 $\mu$ L的血红蛋白溶液。分别用pH 6.6和pH 10.7的样品施加缓冲液(洗脱缓冲液A)进行第一测试。对于每个pH值,计算出流经柱子和保留在柱子上的血红蛋白量。通过在血红蛋白注射之后进行空白注射对遗留进行评估。

[0139] 在396nm(血红蛋白的最大吸收)监测柱洗脱液。经测试的柱子包括来自Merck的LiChrospher®RP-18 ADS(Merck,Darmstadt,德国,订单号1.50947.0001)和来自ChromTech Ltd.,Cogleton,英国的Biotrap500MS,订单号BMS134K。

[0140] a) pH 6.6时血红蛋白干扰的评估(5mM乙酸铵)

[0141] 使用来自Merck的LiChrospher®RP-18ADS柱子。将10 $\mu$ L样品(在pH 6.6,将150mg/mL血红蛋白溶解在5mM乙酸铵中)施加于柱子。对于血红蛋白的洗脱,分别使用利用两种缓冲液的流动相(A)于H<sub>2</sub>O中的5mM乙酸铵(pH 6.6)和(B)于乙腈(ACN)中的5mM乙酸铵(pH6.6)。如下进行洗脱,以100%(A)等度进行15.0min,然后使用100%(A)-0%(B)至0%(A)-100%(B)的线性梯度进行30.0min,随后通过以100%(B)进行2.0min的冲洗步骤检测与RAM反相结合的任何血红蛋白。流速为1.5mL/min,并且所有步骤在室温下进行。

[0142] 于pH 6.6,血红蛋白主要存在于穿流(设定为100%),部分地在约15%B时洗脱(24%),并且也存在于100%(B)冲洗步骤中(4%)。然而,该分离并不总是可再现的,两部分未保留的以及保留的血红蛋白各自的准确定量是相当困难的,这是因为穿流峰导致的检测器饱和以及保留峰的较大宽度和平坦(参见图1)。在冲洗峰中的血红蛋白非常关键,由于这很有可能暗示在由溶血产物进行待分析物测量的在线装置中血红蛋白的干扰。由于血红蛋白已存在于清洗步骤中,血红蛋白遗留的风险,即在之前施加于在线系统的样品中所包含的血红蛋白对任何其后的待分析物的检测的干扰的风险将非常高,并且将导致例如用于质谱检测的电喷雾离子源的污染。

[0143] b) pH 10.7时血红蛋白干扰的评估(10mM乙醇胺)使用来自Merck的LiChrospher®RP-18ADS柱子。将10 $\mu$ L样品(在pH 10.7,将150mg/mL血红蛋白溶解在10mM乙醇胺中)施加于柱子。对于RAM-结合的血红蛋白的洗脱,分别使用利用两种缓冲液的流动相(A)于H<sub>2</sub>O中的10mM乙醇胺(pH 10.7)和(B)于ACN中的10mM乙醇胺(pH10.7)。如下进行洗脱,以100%(A)等度进行15.0min,然后使用100%(A)-0%(B)至0%(A)-100%(B)的线性梯度进行30.0min,随后通过以100%(B)进行2.0min的冲洗步骤检测与RAM反相结合的任何血红蛋白。流速为1.5mL/min,并且所有步骤在室温下进行。于pH 10.7,血红蛋白主要存在于穿流(设定为100%),部分地在约20%B时洗脱(20%),并且在清洗峰中不以任何显著水平存在(参见图2)。在应用100%(B)之后观察到的清洗峰中不存在血红蛋白是非常重要的,因为这将表明在这些缓存条件下,血红蛋白将不会导致任何记忆效应,即它不会存在于使用相同柱子的后续测量中。实际上在pH 10.7没有观察到遗留。该pH值似乎适宜于避免加载到RAM上的不同注射之间的血红蛋白遗留,并因此避免记忆效应。

[0144] 为了使在线方法与常规要求完全相容,该方法也必须要求不会被遗留问题所困扰。当由已溶血的全血样品测量待分析物,遗留问题主要源自于血红蛋白遗留,这是因为血红蛋白代表了溶血产物中最丰富的多肽。通过在血红蛋白样品后进行空白注射研究血红蛋

白遗留。替代含有血红蛋白的样品,将10 $\mu$ L 10mM乙醇胺(pH 10.7)施加于同一柱子上。所有其他缓冲/洗脱条件保持不变。由图3可以看到,在该空白注射中未能鉴别出血红蛋白。这意味着在该缓冲条件下,在穿流和下一次运行中都没有发现血红蛋白。在这些缓存条件下,没有血红蛋白将干扰令人感兴趣的待分析物的测量。

[0145] 应当提及的是这些非常积极的观察结果是在与该RAM柱子的制造商所指定的pH-范围相去甚远的缓冲/运行条件下获得的。

[0146] 实施例2

[0147] 人全血样品溶血产物中盐酸四环素的定量

[0148] 在该系列试验中,使用Biotrap 500MS®柱子。全血已经过差分溶血并用作样品,或者用作基质以供加入潜在令人感兴趣的待分析物。由于实施例1中所描述的积极试验,使用pH 10.7的施加和洗脱缓冲液。对于特殊待分析物的检测,使用线性四极杆质谱。

[0149] a) 血液溶血产物的制备

[0150] 将抗凝结全血保存于+4 $^{\circ}$ C直至分析。通过将0.7g C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>ClN(氯化1-甲基-辛基-吡咯烷盐)和0.3g KSCN在25mL H<sub>2</sub>O中混合从而制备差分溶血用试剂。

[0151] 通过在轻柔搅拌下将1:10稀释的血液(在150mM NaCl中稀释)和溶血剂以1比1的比率相混合从而得到血液溶血产物。在数分钟后,血液样品变得清澈并且已准备好用于HPLC-MS系统注射。遗憾的是,差分溶血的显著效果在黑白复制图并不容易看清。因此没有展示图片。然而,形成清澈的经差分溶血的全血样品的该过程可由本领域技术人员容易地进行重复再现。应当提及的是,在10mM乙醇胺中血液稀释后,适宜的(差分)溶血产物的制备是不可能的。因此,首先通过将300 $\mu$ L全血与2.7mL150mM NaCl以及随后的3mL溶血剂相混合从而在中性条件下制备血液溶血产物。已差分溶血的血液样品然后在碱性条件(10mM乙醇胺,pH 10.7)下注射到以下所述的SPE-HPLC-MS装置中。

[0152] b) 试验装置

[0153] 显示所述分析装置的设计图在图4中得以描述。于pH 10.7将样品注射到Biotrap 500MS,并在于样品中所含的血红蛋白从柱子中流出之后,通过切换六通阀将令人感兴趣的待分析物转移到HPLC和质谱检测。上样泵是来自Dionex,德国的P680HPLC泵,注射系统由装有2.5mL外环路的Rheodyne 6-通阀(7725)构成。利用在Biotrap 500MS俘获柱子之后实施的二极管阵列检测器UVD340U(Dionex)进行血红蛋白监测。切换单元由Rheodyne 6-通阀(7000)构成。由来自BischoffAnalyse-technik und Geräte Leonberg,德国的Prontosil 300-5-C18-H5 $\mu$ m(125 $\times$ 2.0mm)分析柱进行洗脱。由来自Flux Instruments,瑞士的Rheos 2000泵完成洗脱剂输送。利用来自Thermo Finnigan,CA,USA的线性四极杆Surveyor MSQ进行待分析物的MS检测。

[0154] c) 四环素的检测

[0155] 使用两个不同的样品并且将相应的色谱图相互进行比较。第一样品是没有加入四环素的纯溶血产物。第二样品是加入四环素的溶血产物。对于第二样品,将30ng盐酸四环素加入到3mL全血溶血产物(150 $\mu$ L血液+1,350 $\mu$ L 150mM NaCl+1,500 $\mu$ L溶血剂)中。所得盐酸四环素的浓度应当对应于全血中200pg/ $\mu$ L。

[0156] 2.5mL的每份样品注入Biotrap 500MS并用10mM乙醇胺以3.2mL/min进行冲洗。在18min后,切换6-通阀,以300 $\mu$ L/min在分析柱上进行洗脱(缓冲液(A):H<sub>2</sub>O+0.05%TFA,缓冲

液(B):ACN+0.05%TFA;线性梯度为7.5min 10-30% (B),随后2.5min 30-100% (B),以及2min 100% (B)的等度条件)。通过监测 $m/z$  445.2 $\pm$ 1.0进行质谱检测。分别对应于空白运行和每 $\mu$ L血液200pg盐酸四环素的注射的离子监测色谱描述在图5和图6中。由这些图所示,检测全血溶血产物中的200pg/ $\mu$ L的四环素是可行的。然而,具有相同 $m/z$ 的化合物的相邻洗脱使之不能以更低水平或者在更小浓度的样品中检测四环素。通过采用在离子阱或三重四极杆色谱上进行监测的选定反应在随后的试验中对该问题进行论述。

[0157] d) 遗留试验

[0158] 为了检查血红蛋白在Biotrap 500MS上的遗留,注入2.5mL全血溶血产物。利用10mM乙醇胺以3.2mL/min进行18min从而进行Biotrap500MS上的上样步骤。然后切换6-通阀,并用以下梯度进行回流洗脱:ACN+0.05%TFA(7.5min 10-30% (B),2.5min 30-100% (B),2.0min 100% (B)以及7.9min 0% (B))。

[0159] 在所述回流洗脱中,通过施以H<sub>2</sub>O中10mM乙醇胺(A)至ACN中10mM乙醇胺(B)的梯度,(即2min 0% (B),4min 0-100% (B),6min 100% (B)以及7.9min 0% (B))冲洗样品环。

[0160] 通过在溶血产物注入后进行空白色谱运行检查血红蛋白在Biotrap500MS上的遗留。在396nm进行检测。

[0161] 由图7显而易见的是,即使在由将全血样品溶血得到的溶血产物作为样品于pH 10.7施加到Biotrap 500MS上时,也没有观察到血红蛋白的遗留。

[0162] e) 校准曲线

[0163] 制备五份由盐酸四环素加入血液溶血产物从而构成的样品。四环素在全血中的浓度为200pg/ $\mu$ L、600pg/ $\mu$ L、1,000pg/ $\mu$ L、1,500pg/ $\mu$ L和2,000pg/ $\mu$ L。在被注入的溶血产物溶液中的相应浓度是:9.5pg/ $\mu$ L、28.5pg/ $\mu$ L、47.5pg/ $\mu$ L、70.9pg/ $\mu$ L和94.3pg/ $\mu$ L。对于每份样品,注入2.5mL并如(c)所述进行分析。样品经分析两次或三次。

[0164] 计算校准曲线并绘制在图8中。观察到线性相关( $R^2=0.945$ ),证明了Biotrap 500MS定量提取四环素的能力,因此针对其他以临床意义浓度(全血中200pg/ $\mu$ L)存在的全血溶解产物中的抗生素而言也具有定量能力。三重四极杆分析仪上的MRM检测应当使之能避免由于与混合物共同洗脱导致的积分错误,由此导致更好的抗生素测量。可预期MRM检测使之能实现更低限度的检测。

[0165] 实施例3

[0166] 全血溶血产物中免疫抑制药物的提取

[0167] 在实施例2中,已显示了Biotrap 500 MS RAM从全血溶血产物中提取抗生素的能力。受到这些积极结果的鼓舞,进行进一步的研究所述方法是否也适用于其他令人感兴趣的待分析物。由于免疫抑制药物是非常重要的临床相关待分析物,因此现在研究此类待分析物是否也适用于该基于在实施例2中描述和使用的优异在线检测方法。

[0168] 被研究的待分析物是他克莫司和纳巴霉素。他克莫司以FK-506一水合物市售可得并且购自Sigma(CAS#109581-93-3)。纳巴霉素(也称为西罗莫司)也由Sigma提供(CAS#53123-88-9)。

[0169] 将不同量的免疫抑制药物加入全血溶血产物中。在pH 10.7,将所述样品注入Biotrap 500MS并提取。在10min后,通过切换6-通阀将免疫抑制药物(即,令人感兴趣的待分析物)转移至分析柱。分析装置的设计图在图9中进行了描述。上样泵是来自Dionex,德国

的P680HPLC泵,注射系统由装有2.5mL外环路的Rheodyne 6-通阀(7725)构成。切换单元由Rheodyne 6-通阀(7000)构成。由来自Bischoff Analysentechnik und Geräte Leonberg,德国的Prontosil 300-5-C18-H 5 $\mu$ m(125 $\times$ 2.0mm)分析柱进行洗脱。由来自Flux Instruments,瑞士的Rheos 2000泵完成洗脱剂输送。利用二极管阵列检测器UVD340U(Dionex)进行待分析物监测。因此,与实施例2e)的设置不同,此处选择了灵敏度和选择性更低的检测方法。

[0170] 首先将未加入任何免疫抑制药物的溶血产物注入HPLC系统,并在291nm和278nm(即分别为他克莫司和纳巴霉素的 $\lambda_{max}$ )进行监测。

[0171] 然后,将他克莫司和纳巴霉素的溶液注入HPLC-UV以确定它们的保留时间。大量的免疫抑制药物注入HPLC-UV系统以获得明确的确认。

[0172] 最后,将他克莫司和纳巴霉素加入全血溶血产物中并用在线SPE-HPLC-UV进行分析。色谱图描绘在图10和图11中,所述色谱图在将他克莫司和纳巴霉素分别以相当于291.1ng/ $\mu$ L和20.0ng/ $\mu$ L的浓度加入溶血产物后得到。正如所示(由这些图中的箭头标明),可以明确鉴别出加入到全血溶血产物中的他克莫司和纳巴霉素。本领域技术人员将注意到,注入到SPE-HPLC-UV系统中的免疫抑制药物的量相当大。对于他克莫司和纳巴霉素而言,使用二极管阵列UV检测器进行检查的限度为约291ng/ $\mu$ L和约20ng/ $\mu$ L。然而,本领域技术人员将理解,当使用如上所述的用于四环素测定的选定反应监测串联质谱时,应当能达到临床相关的更低的检测限。

[0173] 因此可以得出结论,似乎通过使用合适的缓冲液和市售提供的RAM,全血样品中许多令人感兴趣的待分析物的在线检测是可行的,并因此具有重要的临床分析以及商业用途。

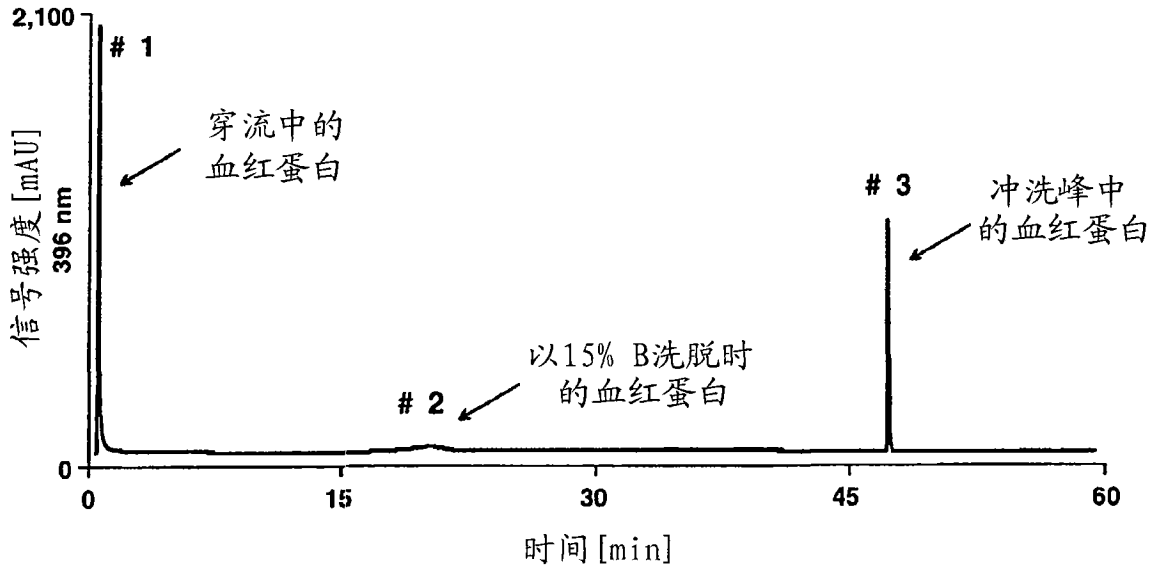


图1

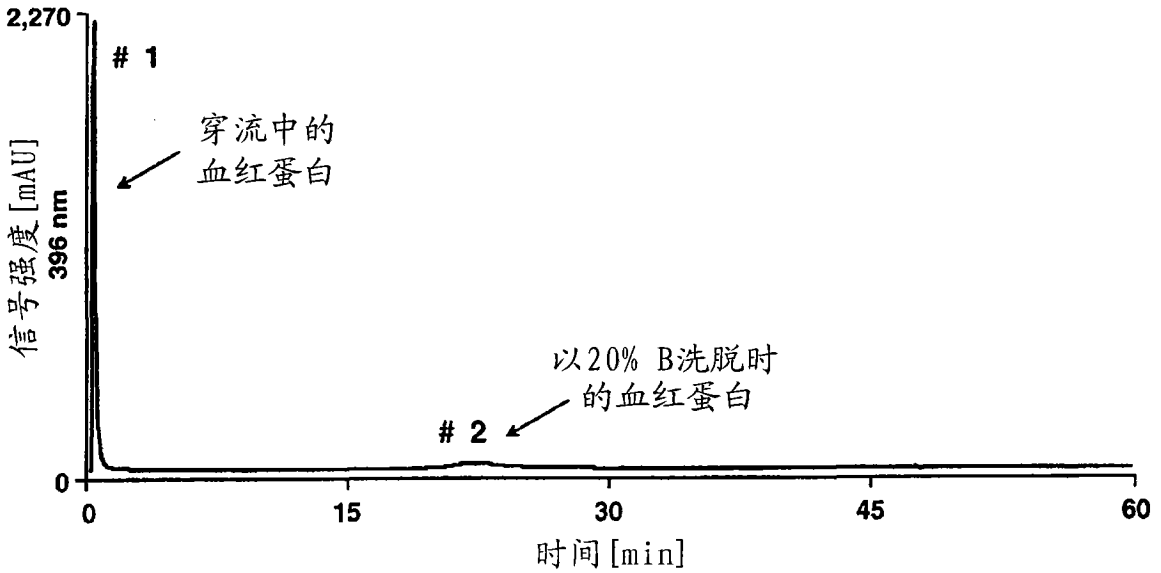


图2

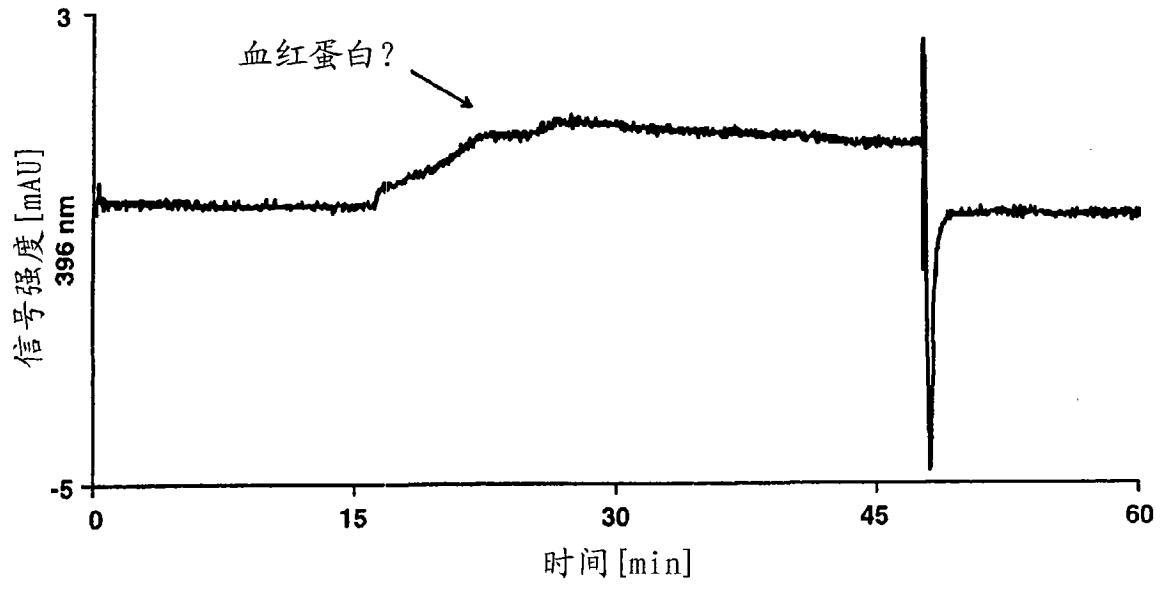


图3

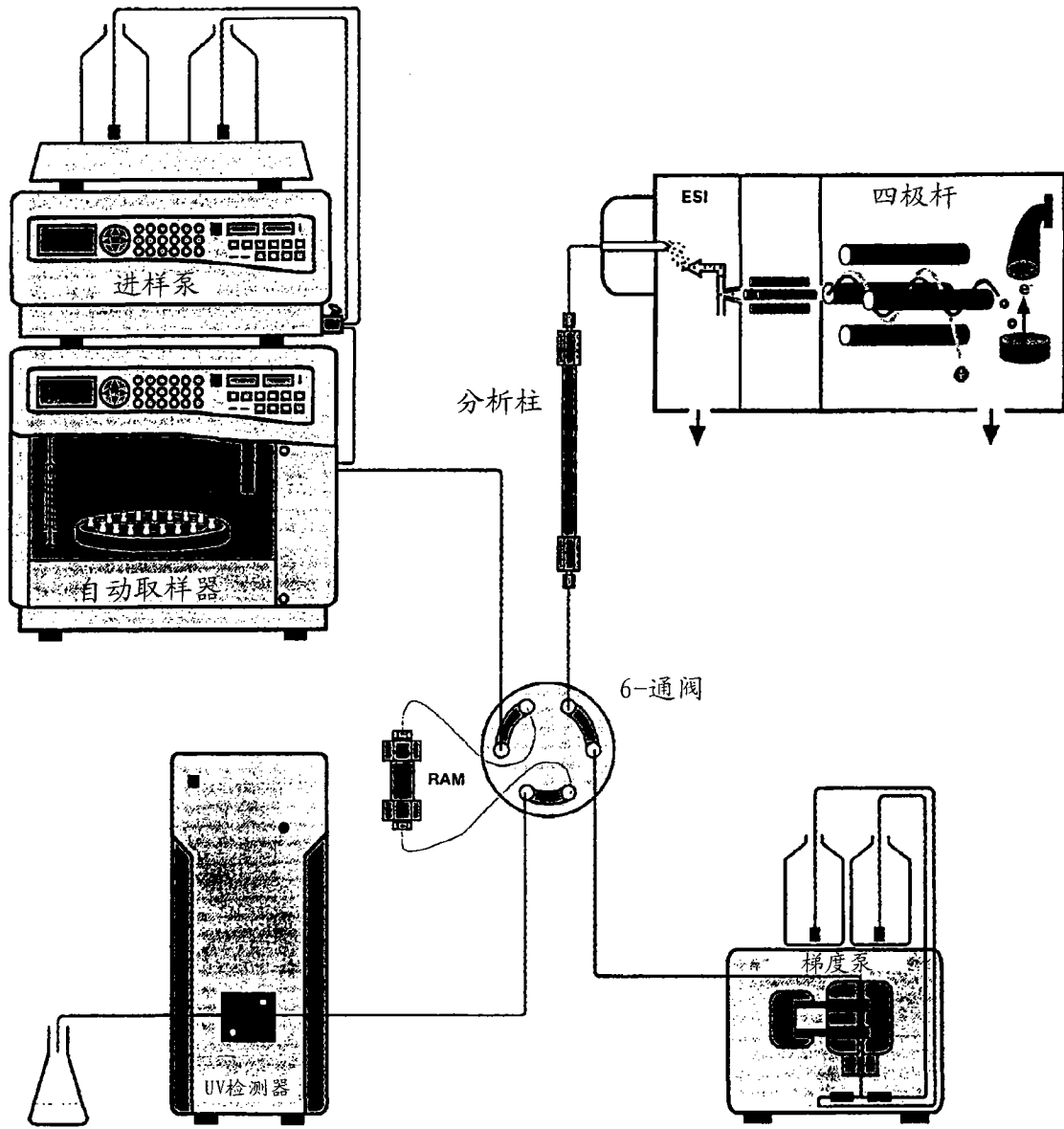


图4

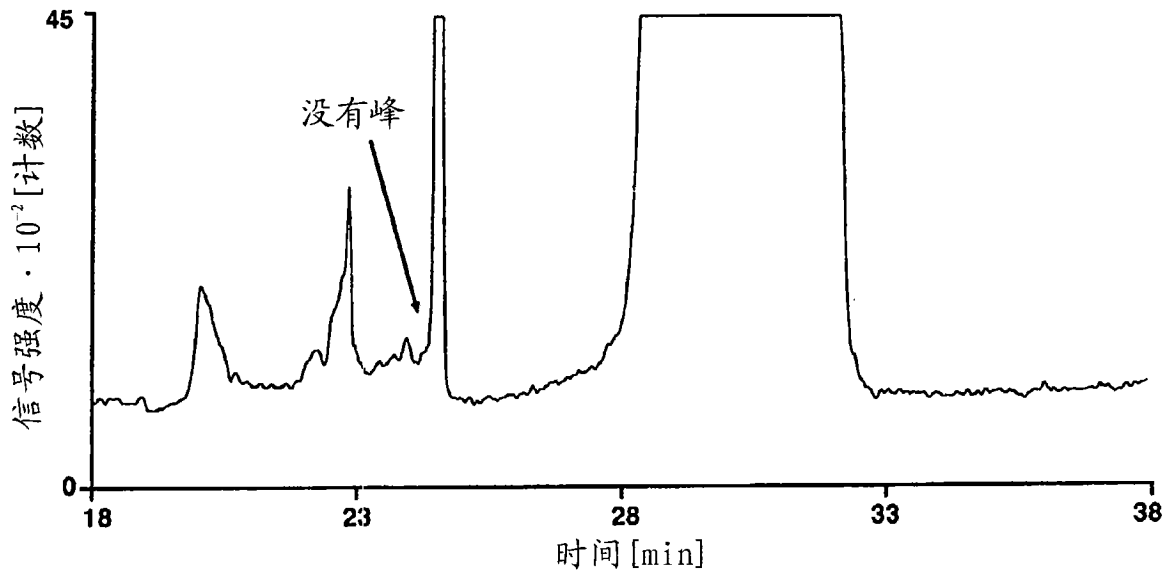


图5

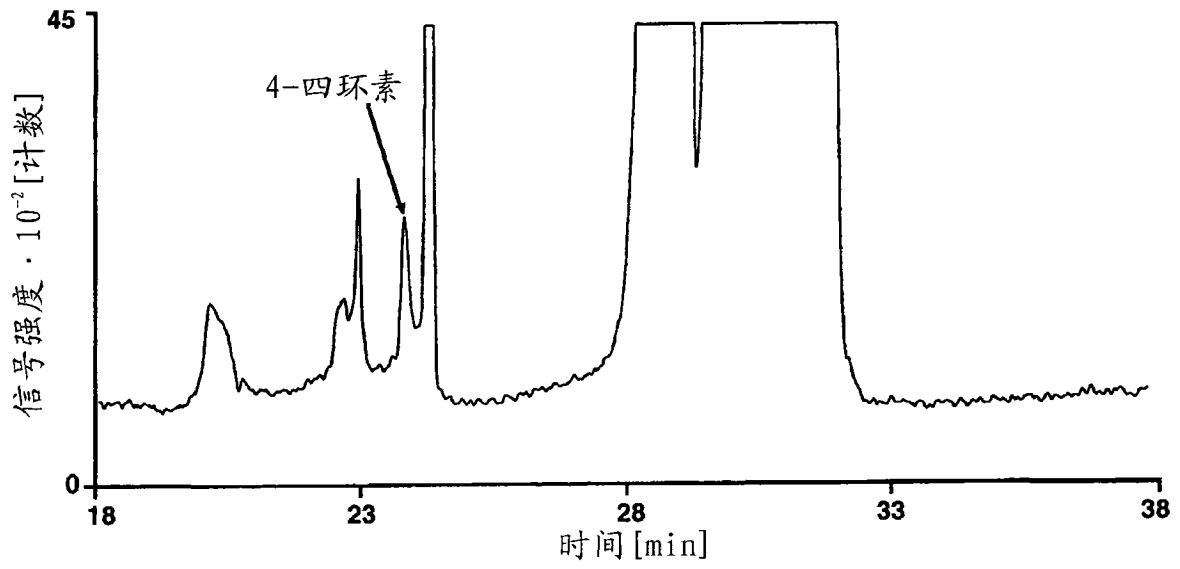


图6

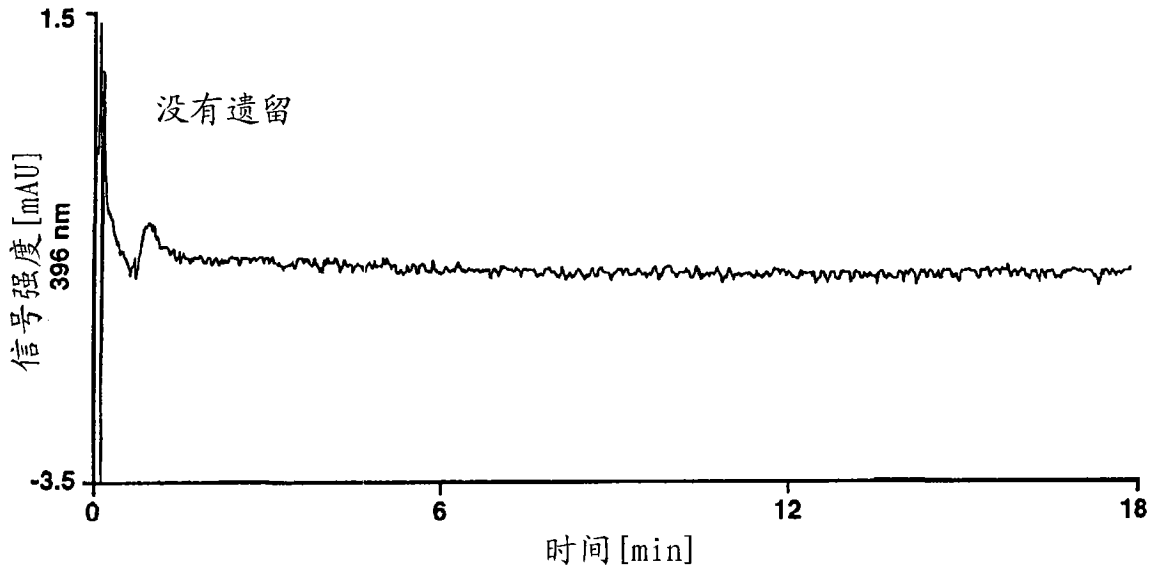


图7

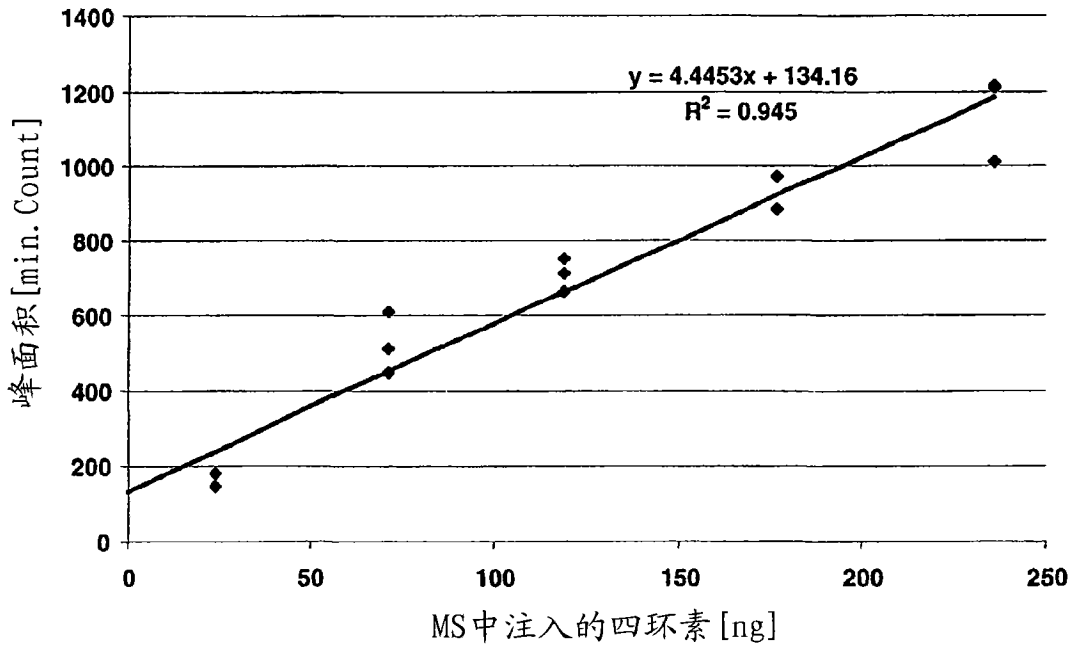


图8

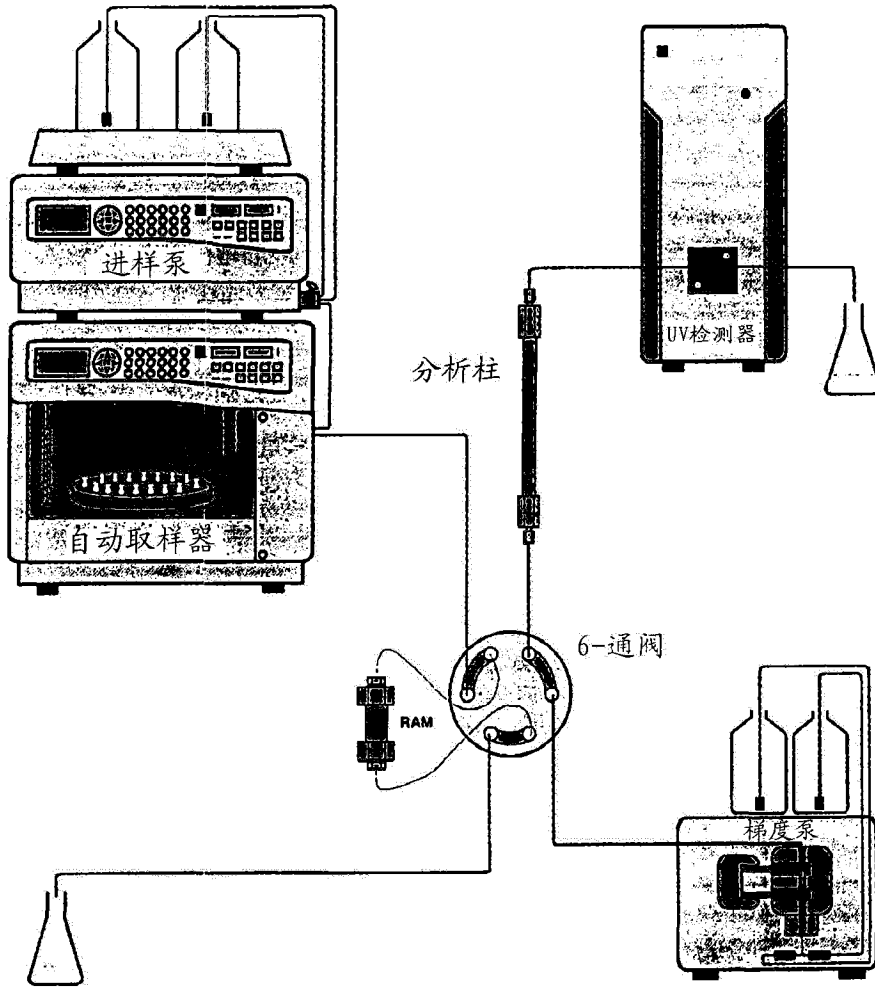


图1: 用于从真实血液溶血产物中提取免疫抑制剂的HPLC装置

图9

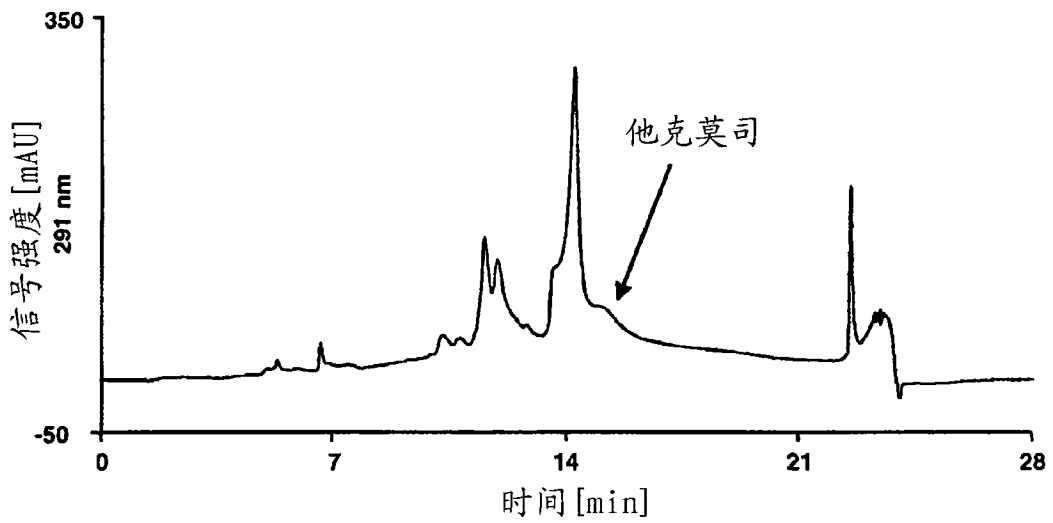


图10

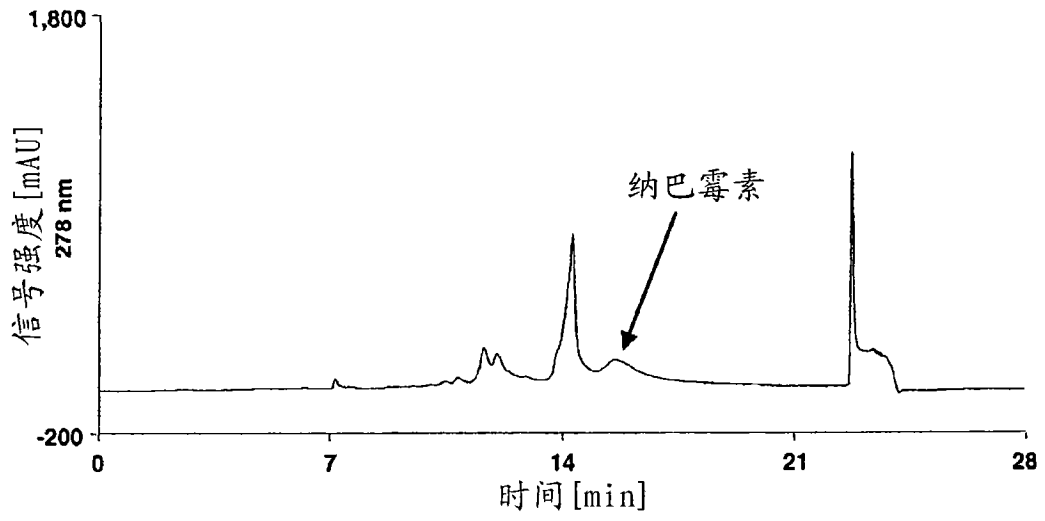


图11

专利名称(译)	已溶血的全血样品中待分析物的检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN101680885B</a>	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	CN200880018981.5	申请日	2008-06-04
申请(专利权)人(译)	霍夫曼 - 拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	U科博尔德 N德尔莫特 C休伯 H冯德埃尔茨		
发明人	U·科博尔德 N·德尔莫特 C·休伯 H·冯德埃尔茨		
IPC分类号	C07K14/00 G01N33/50 G01N33/538 B01D15/34		
CPC分类号	G01N33/538 G01N30/02 G01N33/5002		
代理人(译)	刘锴		
审查员(译)	丁海		
优先权	2007011169 2007-06-06 EP		
其他公开文献	CN101680885A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及在已溶血的全血样品中检测待分析物的方法，所述方法包括将已知或者疑似含有令人感兴趣的待分析物的已溶血的全血样品施加于到含有限进色谱材料(RAM)的柱子，从而结合所述待分析物，将所述待分析物从所述RAM上洗脱并检测所述待分析物，其中，至少在第一步中使用pH高于8.0的缓冲液。优选为所述已溶血的全血样品获得自差分溶血。所述新方法确保了，尤其是在后续分析中，血红蛋白不干扰令人感兴趣的待分析物的检测。所述方法可容易地应用于例如来自已溶血的全血样品的许多待分析物的在线检测中，例如应用于抗生素、叶酸或诸如他克莫司或西罗莫司等免疫抑制药物的检测。

