



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 00811667.9

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1129790C

[22] 申请日 2000.7.17 [21] 申请号 00811667.9

[30] 优先权

[32] 1999. 7. 16 [33] JP [31] 203406/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/04792 2000.7.17

[87] 国际公布 WO01/06243 日 2001.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.10

[71] 专利权人 旭化成株式会社

地址 日本国大阪府

[72] 发明人 北口畅哉 金川章孝 片仓直子

审查员 石剑平

[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

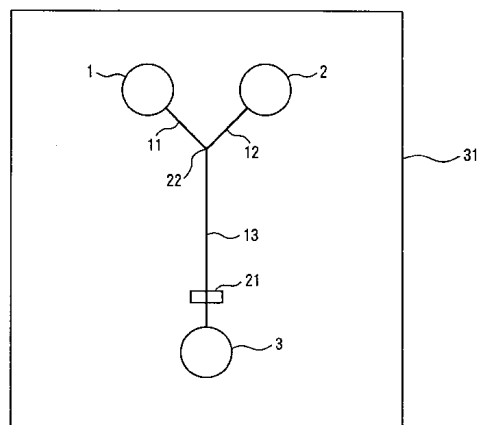
代理人 李华英

权利要求书 7 页 说明书 63 页 附图 20 页

[54] 发明名称 测定物质的方法和用于该方法中的
测定试剂

[57] 摘要

一种用于测定物质的方法，其特征在于在微片的毛细管中进行样本制备和用光热转换检测方法进行检测。根据该方法，可以在短时间内很方便地从生物成份来源的极少量样本中定量存在于生物成份来源的样本中的血红蛋白、ALP 等。另外，测定仅形成很少量的废液。由于使用长波长激光做为激发光，因此可以很经济地生产光热转换检测装置，所以测定可以以低成本进行。由于这些特征，上述方法适用于 POC 分析等。另外，通过使用该方法，即使血样显示有乳糜存在但仍可用光热转换检测方法很方便地检测。一种测定试剂，使得可以用光热转换检测方法很稳定地定量源自生物成分的微量样本中的血红蛋白、ALP 等。



1. 一种用于检测采自活有机体成分中的物质的方法，其特征在于它包括制备样本的步骤和光热转换检测步骤：
 - a) 样本制备步骤是制备待测样本的步骤，它包括子步骤：将从活有机体成分采集的样本与测定试剂混合并反应；生成反应产物，而不产生过氧化氢，该反应产物以对应于该物质的量在一波长处的吸收峰不同于该物质的吸收峰；
 - b) 光热转换检测步骤是用激发光照射待测样本引起的待测样本局部温度的变化而测定待测样本发生的物理量变化，将所述样本的物理量的变化转换成所述物质的浓度；
反应产物是水溶性的，反应产物在激发光的波长范围内的吸光度足以引起温度改变。
2. 根据权利要求 1 的用于测定物质的方法，其特征在于物理量的变化是折射指数的改变，光热转换检测步骤是测定探测光的变化步骤，这种探测光的变化是由进入到热透镜引起的，其中热透镜由于折射指数的变化而形成。
3. 根据权利要求 1 的测定物质的方法，其特征在于激发光的波长是 600 纳米或以上。
4. 根据权利要求 2 的测定物质的方法，其特征在于激发光的波长是 600 纳米或以上。
5. 根据权利要求 1 的用于测定物质的方法，其特征在于通过将活有机体成分采集的样本和测定试剂装入包含毛细管的微片中，在微片的毛细管中进行样本制备步骤和光热转换检测步骤。
6. 根据权利要求 2 的用于测定物质的方法，其特征在于通过将活有机体成分采集的样本和测定试剂装入包含毛细管的微片中，在微片的毛细管中进行样本制备步骤和光热转换检测步骤。
7. 根据权利要求 3 的用于测定物质的方法，其特征在于通过将活有机体成分采集的样本和测定试剂装入包含毛细管的微片中，在微片

的毛细管中进行样本制备步骤和光热转换检测步骤。

8. 根据权利要求 4 的用于测定物质的方法，其特征在于通过将活有机体成分采集的样本和测定试剂装入包含毛细管的微片中，在微片的毛细管中进行样本制备步骤和光热转换检测步骤。
9. 根据权利要求 5 的测定物质的方法，其特征在于通过将一对平面构件粘合在一起，这一对平面构件中至少其一的表面上有槽，将这一对平面构件使其有槽的表面向内互相粘合到一起形成毛细管。
10. 根据权利要求 6 的测定物质的方法，其特征在于通过将一对平面构件粘合在一起，这一对平面构件中至少其一的表面上有槽，将这一对平面构件使其有槽的表面向内互相粘合到一起形成毛细管。
11. 根据权利要求 7 的测定物质的方法，其特征在于通过将一对平面构件粘合在一起，这一对平面构件中至少其一的表面上有槽，将这一对平面构件使其有槽的表面向内互相粘合到一起形成毛细管。
12. 根据权利要求 8 的测定物质的方法，其特征在于通过将一对平面构件粘合在一起，这一对平面构件中至少其一的表面上有槽，将这一对平面构件使其有槽的表面向内互相粘合到一起形成毛细管。
13. 根据权利要求 1 到 12 中任意一项的测定物质的方法，其特征在于从活有机体成分中采集的样本是血样，所述物质是血红蛋白，样本制备步骤是通过将血样与测定试剂混合以使该血样溶血来制备待测样本的步骤。
14. 根据权利要求 13 的测定物质的方法，其特征在于激发光的波长在 610 纳米到 650 纳米的范围内，并且探测光的波长长于激发光的波长。
15. 根据权利要求 13 的测定物质的方法，其特征在于激发光的波长在 620 纳米到 640 纳米的范围内，并且探测光的波长长于激发光的波长。
16. 根据权利要求 13 的测定物质的方法，其特征在于测定试剂含有具有足以溶血红细胞的浓度的中性表面活性剂，具有足以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白的浓度的氧化剂，和具有足以保持试剂的 pH 值

在 5 到 7 范围内的浓度的缓冲液。

17. 根据权利要求 14 的测定物质的方法, 其特征在于测定试剂含有具有足以溶血红细胞的浓度的中性表面活性剂, 具有足以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白的浓度的氧化剂, 和具有足以保持试剂的 pH 值在 5 到 7 范围内的浓度的缓冲液。
18. 根据权利要求 15 的测定物质的方法, 其特征在于测定试剂含有具有足以溶血红细胞的浓度的中性表面活性剂, 具有足以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白的浓度的氧化剂, 和具有足以保持试剂的 pH 值在 5 到 7 范围内的浓度的缓冲液。
19. 根据权利要求 16 的测定物质的方法, 其特征在于该测定试剂不含有氰化物。
20. 根据权利要求 17 的测定物质的方法, 其特征在于该测定试剂不含有氰化物。
21. 根据权利要求 18 的测定物质的方法, 其特征在于该测定试剂不含有氰化物。
22. 根据权利要求 13 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
23. 根据权利要求 14 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
24. 根据权利要求 15 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
25. 根据权利要求 16 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
26. 根据权利要求 17 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
27. 根据权利要求 18 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
28. 根据权利要求 19 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。

29. 根据权利要求 20 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
30. 根据权利要求 21 的测定物质的方法, 其特征在于血样与测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。
31. 根据权利要求 1 到 12 中任意一项的测定物质的方法, 其特征在于该物质是磷酸酶, 测定试剂含有磷酸酶的底物, 样本制备步骤是通过将采自活有机体成分的样本与测定试剂混合, 以用测定试剂中的底物与采自活有机体成分的样本中的磷酸酶反应来制备待测样本的步骤。
32. 根据权利要求 31 的测定物质的方法, 其特征在于这些物质具有磷酸酯键。
33. 根据权利要求 31 的测定物质的方法, 其特征在于该物质是 5-溴-4-氯-3-吡啶氧基磷酸酯及其盐中的任意一种。
34. 根据权利要求 32 的测定物质的方法, 其特征在于该物质是 5-溴-4-氯-3-吡啶氧基磷酸酯及其盐中的任意一种。
35. 根据权利要求 31 的测定物质的方法, 其特征在于该磷酸酶是碱性磷酸酶。
36. 根据权利要求 32 的测定物质的方法, 其特征在于该磷酸酶是碱性磷酸酶。
37. 根据权利要求 33 的测定物质的方法, 其特征在于该磷酸酶是碱性磷酸酶。
38. 根据权利要求 34 的测定物质的方法, 其特征在于该磷酸酶是碱性磷酸酶。
39. 根据权利要求 31 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。
40. 根据权利要求 32 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。
41. 根据权利要求 33 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。

42. 根据权利要求 34 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。
43. 根据权利要求 35 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。
44. 根据权利要求 36 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。
45. 根据权利要求 37 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。
46. 根据权利要求 38 的测定物质的方法, 其特征在于待测样本中底物的浓度在 1 到 15mM 范围内。
47. 根据权利要求 31 的测定物质的方法, 其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
48. 根据权利要求 32 的测定物质的方法, 其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
49. 根据权利要求 33 的测定物质的方法, 其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
50. 根据权利要求 34 的测定物质的方法, 其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
51. 根据权利要求 35 的测定物质的方法, 其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
52. 根据权利要求 36 的测定物质的方法, 其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
53. 根据权利要求 37 的测定物质的方法, 其特征在于从将采自活有机

体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。

54. 根据权利要求 38 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
55. 根据权利要求 39 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
56. 根据权利要求 40 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
57. 根据权利要求 41 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
58. 根据权利要求 42 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
59. 根据权利要求 43 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
60. 根据权利要求 44 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
61. 根据权利要求 45 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。
62. 根据权利要求 46 的测定物质的方法，其特征在于从将采自活有机体成分的样本与测定试剂反应到测定物理量的变化之间的时间在 3 到 15 分钟范围内。

63. 一种用于检测有乳糜的血样中的物质的方法，其特征在于它包含：a) 通过将血样与测定试剂混合的制备待测样本的样本制备步骤，和 b) 用激发光照射待测样本引起的待测样本局部温度的变化而测定待测样本发生的物理量变化，并将该物理量的变化转换成所述物质的浓度的光热转换检测步骤。
64. 根据权利要求 63 的用于测定物质的方法，其特征在于物理量的变化是折射指数的改变，光热转换检测步骤是测定探测光的变化的步骤，这种探测光的变化是由进入到热透镜引起的，其中热透镜是由于折射指数的变化而形成的。
65. 根据权利要求 63 或 64 的用于测定物质的方法，其特征在于通过将血样和测定试剂装入包含毛细管的微片中，在微片的毛细管中进行样本制备步骤和光热转换检测步骤。
66. 根据权利要求 65 的测定物质的方法，其特征在于通过将一对平面构件粘合在一起，这一对平面构件中至少其一的表面上有槽，将这一对平面构件使其有槽的表面向内互相粘合到一起形成毛细管。
67. 一种用于权利要求 13 的测定物质的方法中的测定试剂，其特征在于它含有具有足以溶血红细胞的浓度的中性表面活性剂，具有足以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白的浓度的氧化剂，和具有足以保持试剂的 pH 值在 5 到 7 范围内的浓度的缓冲液。
68. 一种用于权利要求 31 的测定物质的方法中的测定试剂，其特征在于它包含具有磷酸酯键的底物。
69. 根据权利要求 68 的测定试剂，其特征在于该底物是 5-溴-4-氯-3-吡啶氧基磷酸酯及其盐中的任意一种。

测定物质的方法和用于该方法中的测定试剂

发明领域

本发明涉及一种简单且方便的测定很少量采集的样本中的物质的方法。另外，本发明还涉及用于上述方法中的试剂。

发明背景

近来，在需要进行分析 and 测定的现场或现场附近（以下简称为“POC（护理点（point of care））分析等”）进行分析和测定的重要性越来越引起重视，诸如用于床边诊断的分析，它在病人的旁边进行用于医疗诊断所需的测定（POC 分析），在现场，即在河流或废物处理中心进行河流或废物中的有害化学物质的分析，在例如制备或烹调食物、收割庄稼，或进口食品的现场进行的污染物测试。对用于适合这些 POC 分析等的测定的方法和仪器的研究被认为十分重要。

在这些 POC 分析等中，需要进行价廉、简单、容易并省时的测定。特别是用于医疗诊断的分析，需要缩短分析时间，降低用于分析所需的样本量（血液等）以及分析后的废物量。

吸收分光光度法作为用于上述 POC 分析和等等的测定方法被普遍并频繁能使用。在进行吸收测定时的标准光程长度根据测定的敏感性被认为是 1 厘米；然而，即使将它缩短到几个毫米，测定也是可以进行的，然而，敏感性将略有降低。

关于在这样低的光程长度下进行吸收测定，有几种公开的方法，例如，日本专利公开号 10-501340，日本专利公开号 9-504732（这是由 Abaxis 有限公司提交的两份申请），日本专利公开号 9-196920（免疫学）、日本专利公开号 8-114539（生物化学）、日本专利公开号 9-196739（溶解头检测（液 head sensing）、日本专利公开号 9-138195（通过测定多孔材料的光透射进行分析）（这四个是由 Nihon Mediphsics 有限公司提交

的)。

然而, 如果采集的样本量非常少, 具有毫米量级光程长度的检测杯(池)的容积对于样本量来说太大。当将采集的样本的量调至检测池的容积大小时, 在调节过的样本中的物质的浓度有时会变得太低以至于不能进行分析。

为了克服这种问题, 现在已有人提出通常被称为 μ TAS ((微量级(micro total)分析系统)或 Lab-on-chip(《传感器和促动器》, B1, (1990), 244-248, A. Manz 等)的分析方法的概念。这些方法致力于使当今使用的用于分析的仪器小型化, 并通过使用配置有宽度和深度都仅有几个微米到几百个微米的毛细管的小到几个平方厘米大小的微片进行样本的离析和反应, 从而使微量分析能更简单且容易地进行。

关于 μ TAS, 它的研究工作仍然在进行, 设想它是一种能够分析非常小量样本的测定方法(参加日本专利公开号 2-245655)。 μ TAS 进行离析、反应, 并且还能够对宽度和深度都仅有几个微米到几百个微米大的槽(毛细管)内的样本进行测定, 这些槽提供在例如最大为 10×10 平方厘米大小, 或小至几个平方厘米或更小的玻璃、硅和有机聚合物这些微片的表面。使用这样的微片所具有的优势是能够使得采集的样本、分析中所需的试剂、废物或例如分析中可扩大的液体废物的任何一种的量很小, 还使得在分析中所用的时间通常也很短。

然而, 当将上述配置有槽的微片进行吸收分光光度法分析时, 由于微片限制了可利用的光程长度从大约几个微米到几百个微米, 测定不能很满意地频繁进行。原因是, 原则上讲吸收分光光度法检测入射光与透射光的强度比率, 因此, 需要较长的光程长度以获得较高准确率的结果。

因此, 已经设计了一种方法, 用不是垂直于样本液体流动方向(槽的纵向), 而是沿着样本液体流动的方向的光照射配置在微片上的槽(在槽中进行的吸收分光光度法的典型例子是, 例如日本专利公开号 8-304339); 然而, 这种方法的缺陷在于, 在一个形成于平面微片上的槽(毛细管)内在液体流动的方向很难进行检测, 并且, 为了获得较长的光程, 微片以及检测部分的结构变得复杂。

作为检测微量成分的方法，荧光光谱法和发射光谱法是公知的。然而，在这样的方法中，由于抗体和类似的带有酶的标记或荧光染料必须直接或间接地附着在作为待测样本中的测定对象的物质（血红蛋白等）上，因此用于检测的反应变得极端复杂。

还有一些已知的作为另外的检测很小量采集的样本中的物质的方法，已知的有使用光热转换检测方法（热透镜检测方法），在其中样本被激发光激发形成所谓热透镜，并用探测光检测该热透镜中的变化。例如，在日本专利公开号 S60-174933；A. C. Boccara 等在《应用物理学通讯》（Appl. Phys. Lett）36, 130, 1980；液体色谱学杂志（J. Liquid Chromatography）12, 2575-2585（1989）；日本专利公开号 10-142177（分子生物光子学（Molecular BioPhotonics）；和日本专利公开号 4-369467（横滨电子公司（Yokogawa Electric Corporation）中公开了这些方法。

首先，将要描述利用由光热转换现象形成的热透镜的光热转换检测方法（热透镜检测方法）的原理。

用具有被物质（作为溶解于样本溶液中的测定对象）吸收的波长的光照射待测样本。结果，作为测定对象的该物质被激发光激发并产生热（光热转换效应）。在这个操作中，重要的是以这样的方式选择激发光的波长，即溶液中存在的杂质而不是作为测定对象的物质不吸收激发光。

这样产生的热被传递到溶剂中用激发光照射部分的附近，引起局部不仅发生密度变化而且发生折射指数变化。因此，在存在吸收激发光的物质时，在用激发光照射部分似乎形成凹透镜一样。然后用具有不同于激发光波长的探测光照射似乎成为凹透镜的部分。当探测光通过热透镜时它被折射回来，因此，由于热透镜的形成，由光接受器捕获的探测光的量发生降低。

光热转化效应的程度根据作为测定对象的物质的浓度而发生变化；因此，通过测定上述光出现降低的量的程度来定量作为测定对象的物质。实际上，为了改进信噪比，通常将激发光进行截光，只有与频率同步的探测光的量的变化才能被锁定放大器检测到。

热透镜检测方法通常需要两种类型的光源(激光等): 激发光和探测光, 如上所述。存在有使用氩激光器和氦氖激光器的光热转换检测方法(热透镜检测方法)应用到用于毛细管分析的仪器中的情况, 在这种分析中样本溶液从配置有毛细管的微片的外部提供(Bunseki No. 4, 280-284, 1997; M. Harada 等, 化学年报(Anal. Chem.)第65卷, 2938-2940, 1993; Kawanishi 等, 日本分析化学协会, 第44届学术年会演讲要旨(Analytical Chemistry Society of Japan, the Gist of lectures at the 44th Annual Meeting), 第119页, 1995)。

已经对用这种热透镜检测方法定量样本中作为测定对象的物质进行了研究。

例如, K. Sato, T. Kitamori 等已经通过使用氩激光(波长488纳米)作为激发光, 氦-氖激光(波长632.8纳米)作为探测光的热透镜检测方法进行晚霞黄, 一种染料的测定(分析科学(Analytic Sciences)第15卷, 525-529, 1999)。

已经被 Kitamori 等人改进了的热透镜检测方法是这样的, 为了对配置在微片上的深度和宽度都仅有大约几十微米的毛细管中的微量物质进行测定, 利用显微镜将激发光和探测光聚光到毛细管中。用于这种方法中的热透镜可以被称为“显微热透镜”。

在使用这种显微热透镜中, 激发光和探测光被聚焦到毛细管中非常小的空间内。因此, 不产生色差并提供均匀波长的激光优先用作光源。

存在这样的情况, 用热透镜检测方法检测 β -胡萝卜素的含量, 它利用钕: 钇铝石榴石(Nd:YAG)激光(波长: 355纳米)作为激发光, 用氦-氖激光(波长: 632.8纳米)作为探测光(例如, S. Luterotti 等, 《药物和生物医学分析》(Pharmaceutical and Biomedical Analysis) 21, (1999), 901-909, 和 J. Amador-Hernandez 等, 光谱学应用(Applied Spectroscopy)第52卷, 1465-1471, 1998)。

另外, 还有这样的情况, 用热透镜检测方法检测用作药物产品的克伦特罗, 它利用氩激光(波长: 514.5纳米)作为激发光, 用氦-氖激光(波长: 632.8纳米)作为探测光(例如, Y. Martin Biosca 等, 《药物和生

物医学分析》(Pharmaceutical and Biomedical Analysis) 41, (1996), 1037-104 等)。

在上面描述的热透镜检测方法中, 利用在样本中的作为检测对象的物质自身对光的吸收, 和利用输出具有适合各种物质吸收的波长的光的激发光源进行测定。然而, 作为检测对象的物质并不总是在方便用于测定的波长处具有吸收带。

一般来说, 诸如氩激光器和氦-氖激光器这类气体激光器较昂贵。因此, 为了方便并容易进行 POC 分析等, 理想的是用价廉的半导体激光器作为光源。目前, 可利用的价廉的半导体激光器一般输出具有 580 纳米或更长波长的光, 更价廉的一些输出具有 600 纳米或更长波长的光, 非常价廉的一些输出具有 630 纳米或更长波长的光。

因此, 对于其吸收带位于小于上面描述的几种的波长的作为测定对象的物质, 就需要一种方法, 其中用某种方法使作为测定对象的物质产生与它们自身不同的物质, 这种物质具有在 580 纳米或更长波长处的吸收带(以下简称为具有长波长吸收带的物质), 通过测定这种具有长波长吸收带的物质的量来间接测定作为测定对象的物质的量。

本发明的申请人还对使用热透镜测定方法进行物质测定的方法提交了专利申请: 日本专利申请号 10-181586 (用于混合分析的仪器和方法 ("Application and Method for Mixed Analysis")); 日本专利申请号 10-181587 ("用于毛细管光热转换分析的仪器" (Apparatus for Capillary Photothermal Converting Analysis)); 日本专利申请号 10-167603 ("用于分析的仪器" (Apparatus for Analysis)); 国际专利申请 PCT/JP99/03158 ("用于光热转换光谱化学分析的仪器" (Apparatus for Photothermal Converting Spectrochemical Analysis)); 和日本专利申请号 12-2057。

在上面的说明书中, 用于测定血液中总胆固醇浓度和谷草转氨酶 (GOT) 浓度的方法被作为用于分析极小量血样中成分的方法的实施例进行描述。所有这些方法中的要点是: 通过使用作为测定对象的物质作为起始材料的酶促反应产生过氧化氢。

在各种类型的吸收分光光度法中，一种已知的方法是具有较长波长吸收带的物质通过生成过氧化氢而产生，通过测定具有长波长吸收带的物质的量间接测定作为测定对象的物质的量。

例如，在测定血液中总胆固醇浓度时，在下列步骤中产生过氧化氢：用胆固醇酯酶水解胆固醇酯而得到胆固醇；氧化所得胆固醇与从开始在血液中释放的胆固醇。

然后，使过氧化氢使 3,5-二甲氧基-N-乙基-N-(2'-羟基-3'-磺基丙基)苯胺钠（以下简称 DAOS）和 4-氨基安替比林（以下简称 4-AA）经受氧化缩合反应以得到作为反应产物的蓝色染料。然后通过测定蓝色染料的吸光度（波长 600 纳米）得到血液中总胆固醇浓度。这一测试方法在作为由 Wako 纯化学工业有限公司生产的用于《测定总胆固醇和胆固醇 E-HA Test Wako》的 HA Test Wako 所附的示例性单行本中进行了描述。

在 Izumi Kanai 的《临床实验室检验纲要》（An Outline of Clinical Laboratory Test (Kanahara 出版公司, 1998, 555-556) 中描述了用 N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰乙二胺（以下简称 EMSE）替代 DAOS 的吸收分光光度法确定血液中总胆固醇浓度的情况。

在测定血液中 GOT 浓度时，在下列步骤中产生过氧化氢：用采集样本中的 GOT，以左旋天冬氨酸钠和 α -氧代戊二酸作为底物产生草乙酸盐；用草乙酸盐氧化酶从草乙酸盐产生丙酮酸盐；用氧和丙酮酸盐氧化酶氧化丙酮酸盐。

然后，用这样产生的过氧化氢和过氧化物酶，4-AA 和 N-乙基-N-(2-羟基-3-磺代丙基)-间-甲苯胺钠（以下简称为 TOOS）经受氧化缩合反应以得到染料。通过测定染料的吸光度（波长 555 纳米）得到 GOT 浓度。在由 Kainos 有限公司的《用于体外诊断的包装插页集》（Collection of Package Inserts for In Vitro Diagnostic）中描述了这种测定方法。

如上所述，如果能够通过根据作为测定对象的物质选择氧化酶，并使这种选择的氧化酶作用于该物质，产生过氧化氢，则可以相对容易地产生 DAOS（或相似的染料如 EMSE 和 TOOS）和 4-AA 的氧化缩合产物。通过利用长波长激光作为激发光的热透镜检测方法，测定氧化缩合产物（蓝

染料等) 而间接测定这种物质。

然而, 不用说, 并不是所有的物质都能产生过氧化氢。

在用于临床诊断的血液分析中, 例如, 作为测定对象的物质是血红蛋白, 碱性磷酸酶等。然而, 从血红蛋白、碱性磷酸酶等产生过氧化氢的反应是不常见的。因此, 上面描述的利用包括过氧化氢产物的反应进行测定的方法从来都无法在诸如血红蛋白和碱性磷酸酶等物质上进行。

因此, 对于难于产生过氧化氢的诸如血红蛋白等物质, 需要发现一种能够从血红蛋白等中产生在长波长处有吸收的物质的试剂或反应。

当在毛细管中进行测定时, 沉淀的形成对测定产生很大的负面影响。因此, 需要发现一种既不产生沉淀也不产生结晶的试剂或反应。

下面将详细描述用于测定这些物质的传统方法。首先, 将描述用于定量测定血红蛋白的方法。

测定血样中血红蛋白浓度对于临床诊断贫血、高血红蛋白血症 (Polyemia) 等很重要。

利用吸收分光光度法测定血液中血红蛋白浓度的传统方法已经被改进, 从而使它们能适用于相对大的自动化测试仪, 即台式测试仪或测试台仪器 (bench top ones)。因此, 所用的用于测定的小杯 (小池) 大约有几百个微升到 1 毫升大, 光程长度可以设置到大约 2 到 10 毫米, 这使得可以通过吸收分光光度法进行血红蛋白的检测。

传统的用于测定血红蛋白浓度的方法包括, 例如: 氰化高铁血红蛋白方法, SLS 方法, γ 卟啉高铁血红蛋白 (azaidomethemoglobin) 方法和碱性高铁血红素方法, 所有这些都是通过吸收分光光度法进行测定。

作为使全血溶血并用吸收分光光度法测定血红蛋白浓度的方法, 最频繁使用的是氰化高铁血红蛋白的方法, 并且它已经被设计成国际标准。下面将简要描述根据氰化高铁血红蛋白方法确定血红蛋白浓度的方法。

首先, 向血样中加入含非离子型表面活性剂等的红细胞溶解剂, 使溶于红细胞中的血红蛋白被洗脱。然后用氧化剂诸如铁氰化钾氧化洗脱的血红蛋白, 使其转化成高铁血红蛋白。然后通过向内加入氰离子又使高铁血红蛋白转化成氰化高铁血红蛋白, 以制备用于定量血红蛋白的稳定

的样本。

氰化高铁血红蛋白在 540 纳米波长处有一个吸收带，因此，通过测定在 540 纳米波长处的氰化高铁血红蛋白的吸光度，可以定量血红蛋白。氰化高铁血红蛋白在 540 纳米波长处有一个吸收带。然而，在 600 纳米或更长波长处却没有吸收带。因此，根据目前所用的价廉的半导体激光输出具有 600 纳米或更长波长的光这一事实，所以氰化高铁血红蛋白方法不能被应用于利用价廉的半导体激光作为激光光源或吸收光源的定量血红蛋白的方法中。

另外，由于氰化高铁血红蛋白方法使用包含氰化钾，一种有毒物质的测定试剂，对于操作这种测定试剂的相关人员有危害。另外，在处理由测定产生的废液时，包含于废液中的氰化物必须用次氯酸钠等进行降解。因此，废液处理很麻烦。

作为解决与有毒物质相关的这类问题的方法，血红蛋白测定试剂包括：中性缓冲液；十二烷基磺酸钠或月桂基磺酸钠（以下简称为 SLS），一种阴离子表面活性剂，和包含在缓冲液中的 Triton（三硝基甲苯）X-100（商标名），在《临床生物化学》（Clinical Biochemistry）第 15 卷，1982，83 中进行了描述。

在使用上述试剂的方法中，首先通过 SLS 和 Triton X-100 的作用使红细胞溶解，然后，通过 SLS 和氧的作用使洗脱的血红蛋白转化成高铁血红蛋白，然后再转化成 SLS 血红蛋白。这个 SLS 血红蛋白吸收具有 540 纳米波长的光，因此，通过测定在波长 540 纳米处的 SLS 血红蛋白的吸光度可以定量血红蛋白。

这种方法肯定不需要有废液处理的麻烦，因为所用的测定试剂中不包含氰化物。然而，正如氰化高铁血红蛋白一样，SLS 血红蛋白仅吸收具有 540 纳米波长的光，而不吸收具有 600 纳米或更长波长的光。因此，这种方法也不能应用于使用输出具有 600 纳米或更长波长的光的价廉的半导体激光器作为光源的定量血红蛋白的光学方法。

还有一种已知的使用血红蛋白自身的过氧化物酶活性定量血红蛋白的方法。日本专利公开号 S59-222766（Terumo 公司）公开了用于定量血

红蛋白的方法，步骤如下：通过利用血红蛋白自身的过氧化物酶活性，用作为试剂加入的过氧化氢氧化 N-四甲联苯胺，并测定在乙酸中的氧化产物在（波长 660 纳米）处的吸光度。

另外，日本专利公开号 2-122267（Green Cross 公司）公开了一种用于定量血红蛋白的方法，步骤如下：利用血红蛋白自身的过氧化物酶活性，通过用过氧化铈氧化柠檬酸溶液中的 N-四甲联苯胺，并测定氧化产物的吸光度（波长：650 纳米）。

这些方法中的任何一种都不包括溶血红细胞的步骤。因此，用这些方法测定的血红蛋白是包含于血浆、血清和尿中溶解的微量血红蛋白（大约低至全血中血红蛋白浓度的百分之一（10 和几克/分升）），而不是全部的血红蛋白。另外，在这些方法中，由于在血浆等中存在血红蛋白过氧化物酶活性抑制因子，所以很难作出标定曲线。另外，由于这些方法采用吸收分光光度法，因此它们不适合于使用微片的极少量样本的测定。

另一方面，日本专利公开号 9-278786（Pola 化学工业公司）公开了一种方法，它是通常测定在 540 纳米波长处的吸光度的氰化高铁血红蛋白方法的一种改进，其中通过加入果胶或寡半乳糖醛酸而增加了氰化高铁血红蛋白的吸光度，并且测定的敏感度也提高。在这种方法中，当吸光度增加时，氰化高铁血红蛋白吸收的光位移到具有较长波长的光；结果，就可以进行在波长 680 纳米到 685 纳米波长处的测定。然而，即使吸光度增加了，这种方法的吸光度测定还存在敏感度限制（样本量限制），另外，该方法还存在使用氰化物的问题。

还存在一些已知的情况，其中用热透镜检测方法（Wu, Kitamori and Sawada, 化学年报 (Ana. Chem.) 63, 217-219, 1991, Kitamori and Sanda, Bunseki 3, 178-187, 1994）检测白血病患者白血球中的异常血红蛋白的产生。在这种方法中，在显微镜下将载玻片上的单个白血球分离，用 Xe（氙）灯激发血红蛋白以吸收具有 420 纳米波长的光，而血细胞不破裂。通过检测形成于白血球外的上部空间的热透镜，测定由于白血病导致的异常而从白血球产生的血红蛋白的浓度。

然而，为了确定血红蛋白的浓度，需要溶解一定体积的血，并定量来

源于溶血的血液中存在的所有红细胞中的血红蛋白。因此，这种方法不能应用于需要进行贫血诊断的血液中红细胞的血红蛋白的定量。另外，由于所用的激发光的波长是 420 纳米，因此很难利用价廉的半导体激光。

还有一种已知的情况，其中用单束光作为热透镜检测方法测定通过凝胶电泳分离的血红蛋白（MA Thompson 等，《应用光谱学》（Applied Spectroscopy），第 46 卷 945-947，1992）。然而，即使在这种情况下，也要使用昂贵的氩激光（波长 514.5 纳米）作为激发光源。另外，测定中使用较大波长的板状凝胶，或固体相 18 厘米 × 16 厘米 × 750 微米，这完全不可能用于测定在微片中的液体样本。

描述到这里为止，已经知道没有一种方法能够利用极少量血样和具有 600 纳米或以上的波长的激光测定全血中的血红蛋白浓度。

下面，将描述测定血样中磷酸酶的方法。关于测定血样中磷酸酶浓度的方法，使用对-硝基苯基磷酸酯作为底物的方法是用作标准方法的最广泛使用的一种（Izumi Kanai，《临床实验室检验纲要》（An Outline of Clinical Laboratory Test），Kanhara Publishing Compony, 613-615）。在这种方法中，通过以下步骤确定磷酸酶浓度：用磷酸酶水解对-硝基苯基磷酸盐以产生对-硝基苯酚；测定所产生的对-硝基苯酚在 450 纳米波长处的吸光度。

由于对-硝基苯酚在 550 纳米或更长波长处基本上没有吸收带，这个反应体系不适用于使用价廉的激光器的热透镜检测方法中。这在 Denka Seiken 有限公司生产的 ALP-S 试剂包装的插页中进行了描述。

还有一种已知的方法，其中用比色法确定磷酸酶浓度，其步骤如下：通过用偏过碘酸钠使产生的对-硝基苯酚和 4-AA 氧化缩合而生成红色醌染料；测定该形成的红色醌染料在 500 纳米波长处的吸光度（Kainos 有限公司 1998 版的《体外诊断包装插页集》（Collection of Package Inserts for In Vitro Diagnostic），277-278 页）。

另外，已经对一种方法进行了研究，其中用偶氮染料作为碱性磷酸酶（以下简称为 ALP）的底物，其吸收具有较长波长的光，如日本专利公开号 7-33789（Fujj 光学胶片有限公司（Fujj Photo Film Co.Ltd.）中

公开的一样。然而这种方法利用吸收分光光度法进行测定，而不是用光热转换检测方法进行测定。

利用吸收分光光度法进行测定血液样本时出现的常见问题包括：例如乳糜。乳糜是消化期间从肠的乳糜管引入的白色或浅黄色混浊液体，它由淋巴腺经胸导管引入到循环器官中。

由于淋巴液中的乳糜微粒，因此，乳糜看上去好像牛奶（Stedmans, 医学辞典，医学观察有限公司）。换句话说，乳糜是血液中由胆固醇或中性脂肪形成的白色混浊状态的微团或微质粒。

在有乳糜存在的血样中，就会出现“混浊”，当通过吸收分光光度法进行测定时就会对测定结果产生负面影响。换句话说，在吸收分光光度法中，很难区分是由混浊引起的吸收还是由作为测定对象的物质或反应产物引起的吸收。因此，通常经由测定作为测定对象的物质和反应产物没有吸收带的具有 700 到 800 纳米长波长的光作为对照吸光度，然后测定作为测定对象的物质和反应产物有吸收带的波长处的吸光度。然后用二次测定的吸光度值之间的差异来表示测定结果（参考上面引用的文献《临床实验室检验纲要》和由 Kainos 有限公司 1998 年版的《用于体外诊断的包装插页集》）。

这种操作可以校正在吸收分光光度法中小池（小杯）中杂质或污染物的影响。然而，对于每个样本都需要在两个不同波长处进行测定。

本发明旨在克服上述现有技术中存在的问题。因此，它的主要目的是提供一种适合应用到 POC 分析等上的测定方法，该方法的特征在于它使得可以以价廉、简单且容易、耗时很短的根据使用价廉的长波长激光作为激发光源的热透镜检测方法，测定毛细管中从活的有机体成分中采集的极少量样本中的物质。

本发明的一个目的是提供一种测定方法，该方法可以测定特别是诸如血红蛋白和磷酸酶这类很难产生过氧化氢的物质。

本发明的另一个目的是提供一种能够仅用一次测定而能定量即使是乳糜血样中的物质的方法。

本发明还有一个目的是提供一种测定试剂，该试剂适合用于上面提到

的测定方法中，并保证能稳定地测定从活有机体成分中采集的极少量样本中的物质。

发明公开

为了达到上述目的，本发明设计如下：根据本发明用于测定物质的方法是检测从活有机体成分中采集的样本中的物质，或测定该物质的浓度的方法，其特征在于它包括样本准备步骤和光热转换检测步骤，样本准备步骤是准备待测样本的步骤，其子步骤如下：将上述从活有机体成分中采集的样本与测定试剂混合并反应；产生反应产物，没有产生过氧化氢，以对应于上述物质的量在一个不同于上述物质的吸收峰的波长处产生吸收峰，光热转换检测步骤是经由激发光照射上述待测样本使该样本产生局部温度的变化，测定上述待测样本的物理量的变化，上述反应产物是水溶性的，上述反应产物在上述激发光的波长范围内的吸光度足以引起上述温度变化。

如果上述物理量的变化是折射指数的变化，则上述光热转换检测步骤使得有可能测定探测光的变化，这种变化是由于探测光进入到热透镜内而引起的，而热透镜是由于上述折射指数的变化形成的。

优选上述激发光的波长为 600 纳米或更长。

如果将上述从活有机体成分中采集的样本和上述测定试剂装入到包括毛细管的微片中，则可以在微片的毛细管中进行上述样本的准备步骤和上述光热转换检测步骤。

上述毛细管可以通过将各在其表面有一个槽的一对平面构件结合在一起形成，使有槽的表面向内。上述槽可以提供在上述一对平面构件中至少其一上。

如果上述从活有机体成分中采集的样本是血样且上述物质是血红蛋白，另外，如果上述样本准备步骤是通过将上述血样与上述测定试剂混合以溶血该血样的准备上述待测样本的步骤，则可以确定样本中的血红蛋白。

在上述确定血红蛋白时，优选上述激发光的波长在 610 纳米到 650 纳

米范围内, 并且上述探测光的波长比上述激发光的波长长。

上述激发光的波长可以在 620 纳米到 640 纳米的范围内, 同时保持上述探测光的波长比上述激发光的波长长。

上述测定试剂可包含其浓度足以溶解红细胞的中性表面活性剂; 其浓度足以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白的氧化剂; 其浓度足以保持试剂的 pH 质位于 5 到 7 范围的缓冲剂。

优选上述测定试剂不包含氟化物。

优选上述血样与上述测定试剂的混合比例在 1: 1 到 1: 250 范围内。

如果上述物质是磷酸酶, 并且上述测定试剂包含上述磷酸酶的底物, 另外, 如果上述样本准备步骤是通过将上述从活有机体成分中采集的样本与上述试剂混合, 使从上述由活有机体的成分中采集的样本中的磷酸酶与上述测定试剂中的底物反应, 则可以确定从活有机体成分中采集的样本中的磷酸酶。

上述底物可具有磷酸脂键。

优选上述底物是 5-溴-4-氯-3-吡啶氧基磷酸酯及其盐中的任意一种。

上述磷酸酶可以是碱性磷酸酶。

优选在上述待测样本中的底物的浓度在 1 到 15mM 范围。

优选从将上述由活有机体成分中采集的样本与上述测定试剂混合到测定上述在物理量方面的变化的时间在 3 到 15 分钟范围内。

另外, 根据本发明的测定物质的方法是检测有乳糜存在的血样中的物质或测定该物质的浓度的方法, 其特征在于它包括通过将上述血样与测定试剂混合来准备待测样本的样本准备步骤, 和以一个变化测定上述待测样本的物理量的变化的光热转换检测步骤, 其中的变化是指用激发光照射上述待测样本引起的该样本的局部温度的变化。

如果上述物理量的变化是折射指数的变化, 则上述光热转换检测步骤就使得可以测定探测光的变化, 这种变化是由于探测光进入到热透镜内而引起的, 而热透镜是由于上述折射指数的变化所形成的。

如果将上述血样和上述测定试剂装入到包括毛细管的微片中, 则可以在微片的毛细管中进行上述样本的准备步骤和上述光热转换检测步骤。

上述毛细管可以通过将各在其表面有一个槽的一对平面构件结合在一起形成，使有槽的表面向内。上述槽可以提供在上述一对平面构件中至少其一上。

另外，根据本发明的测定试剂是用于上述测定物质，特别是血红蛋白的方法中的测定试剂，其特征在于它包含其浓度足以溶解红细胞的中性表面活性剂；其浓度足以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白的氧化剂；其浓度足以保持试剂的 pH 值位于 5 到 7 范围的缓冲剂。

另外，根据本发明的测定试剂是用于上述测定物质，特别是磷酸酶的方法中的测定试剂，其特征在于它包含具有磷酸酯键的底物。

优选上述底物是 5-溴-4-氯-3-吡啶氧基磷酸酯及其盐中的任意一种。

下面将详细描述本发明。

关于测定包含于从活有机体采集的样本，如血液和尿液，或用于环境分析的样本中的成分的方法，如果样本的量非常小，则使用包括毛细管的微片结合热透镜检测方法的方法。如在背景技术部分所描述的一样，为了根据热透镜检测方法测定深和宽度都仅有几十到几百微米的毛细管中的物质，优选激发光和探测光汇聚到毛细管中。

因此，作为上述两种类型光的光源，优选不使用白光光源，因为它有色差等问题，而使用波长均一的激光器或发光二极管。然而，输出短波长光的激光器或发光二极管非常贵。另外，为了形成热透镜，所用的激发光源需要有一定程度的输出。因此，优选使用目前相对便宜的并且具有一定程度输出的长波长半导体激光器。本发明也可以使用发光二极管作为价廉的光源，只要它们具有高达约几 mW 或更大的输出即可。

激发光和探测光的波长应该长于 580 纳米。特别优选使用输出具有 600 纳米或更长，且 630 纳米或更长波长的半导体激光器和发光二极管，因为它们便宜。

以这些点作为背景，下面将描述根据热透镜检测方法测定毛细管中的物质的条件。

- a) 作为测定对象的物质本身或酶促/化学产生的物质（以下称为反应产物）具有足以形成激发光波长范围内的热透镜的吸光度。

b) 无论作为测定对象的物质还是反应产物在毛细管内都不形成沉淀。

另外, 优选探测光的波长大于激发光的波长, 尽管这不是必要条件。下面将详细描述上面所述的条件。

在存在于从活有机体上采集的样本, 例如血液和尿液样本中的物质里, 很少有在波长 580 纳米或以上处, 特别是, 在 630 纳米或以上波长处的吸收带。即使血红蛋白, 它具有在相对较长波长处的吸收带, 在 540 到 577 纳米处有强吸收带, 然而, 在 630 纳米处仅有微弱的吸收带, 这归结于在活有机体中存在的高铁血红蛋白的量非常少。

胆红素, 例如, 在 630 纳米或以上波长处也具有非常弱的吸收, 这很难定量。

血液中的存在的很多酶是通常仅在紫外区有吸收带的白蛋白。另外, 酶和作为杂质的蛋白质的吸收带互相重叠, 使得它们很难被定量。因此, 在确定血液中酶的浓度时, 必须采取以下步骤以定量酶(将准确定量酶活性): 用对该酶特异的底物产生反应产物, 其中的底物将被该酶转化成在长波长范围内有吸收的物质(反应产物); 定量该反应产物。以下这种类型的反应将被称为长波长吸收生成反应。

在确定血液中非酶类物质, 如胆固醇的浓度时, 必须在选择性作用于作为底物的该物质的酶(该物质与酶反应)的作用或化学反应的帮助下, 从每种物质产生在长波长范围内有吸收的反应产物。

因此, 为了有可能利用价廉的激发光源进行测定, 需要发现一种反应或测定试剂, 它能够从作为测定对象的物质, 以这样一种方式产生上述反应产物, 即使得反应产物在 580 纳米或以上, 更价廉的是在 600 纳米或以上, 最价廉的是在 630 纳米或以上的波长处具有吸收带。反应产物具有吸收带的波长的上限没有特别的规定, 只要该反应产物吸收足够量的激发光并且该光源比较便宜即可。然而, 通常使用 800 纳米或以下的波长。

在临床化学分析中进行有色试剂的研究趋势之一是, 例如, 降低分析时在血液中的存在的干扰物质的影响。这个意思是, 对在比活有机体成分

的固有吸收波长长的波长处有吸收带的有色试剂进行了研究。甚至目前还在对具有长于溶血的血样中的血红蛋白和从有黄疸的病人身上采集的样本中的胆红素的吸收波长长的 $\lambda_{\max}$ 的有色试剂继续进行研究(Norihito Aoyama, 《临床实验室检验》(Clinical Laboratory Test) 41, 9, 1014 (1997))。为了降低血液中血红蛋白和胆红素的影响, 必须在至少 600 纳米或以上的波长范围内进行测定(干扰校验(Interference Check)/A Plus (国际试剂公司)(International Reagents Corporation)的包装插页中的参考数据)。对于测定血红蛋白, 当用普通光源测定血红蛋白和其它生化项目时, 光源的波长在 600 到 650 纳米范围内是重要的, 因为在酸性环境下高铁血红蛋白在 630 纳米波长处有吸收带。

在上述长波长吸收产生反应中, 沉淀的形成是不希望的, 因为混合、反应和测定是在微片的毛细管内进行的。必须避免在毛细管内或微片中毛细管以外的部分形成将阻碍液体(待测样本)流动的大的沉淀。即使很轻微的液流紊乱也会对定量混合和反应时间产生不利影响。

形成于微片的检测部分的沉淀极有可能降低测定的可靠性或准确性。因为它们引起激发光和探测光的散射。另外, 本发明的发明者还发现, 在长波长吸收产生反应中的反应产物的即使极小的沉积(微小沉淀、结晶), 这在吸收分光光度法中几乎不成问题, 而在热透镜检测法中也是个严重问题。

下面将描述对 ALP 测定的例子。ALP 的定量通常通过测定 ALP 的活性来进行。换句话说, 当 ALP 水解底物的磷酸酯部分, 来源于底物的色素产生颜色; 因此, 通过测定该色素可确定 ALP。

通常, 用对-硝基苯酚磷酸盐作为 ALP 的底物, 用吸收分光光度法测定作为水解产物的对-硝基苯酚在 405 纳米附近的吸收。然而, 当使用价廉的激发光源时, 需要产生一个在上述较长波长处具有吸收带的反应产物。研究市售的作为 ALP 底物并能产生在 630 纳米附近具有吸收带的反应产物的试剂包括, 例如, 5-溴-4-氯-3-吡啶氧基磷酸酯。

这种底物, 5-溴-4-氯-3-羟基吡啶的水解产物, 通过氧进行氧化, 并二聚化反应, 产生在 600 纳米或以上具有吸收带的蓝色色素。由于这种

二聚物不是高水溶性的，因此在 ALP 浓度、底物浓度、反应时间等综合的这种条件下，在长波长吸收产生反应中产生的反应产物必须有一个适合于热透镜检测方法的浓度范围。如果反应产物的浓度高于上述范围，将会如后面描述的比较实施例的情况一样形成结晶，从而很难根据热透镜检测方法测定 ALP。

在正常操作中，这种结晶悬浮和分散于溶液中，并且即使静置过夜也不会沉淀。尽管这些结晶在根据吸收分光光度法进行测定时不良影响很小，但在根据热透镜检测方法进行测定时它们有时对测定有不良影响。因此必须通过例如强度离心使它们沉淀。

当吸收激发光的结晶（微小沉淀）悬浮并分散在溶液中从而使得根据热透镜检测方法的输出（热透镜信号）变得不稳定的原因在理论上还没有解释清楚。即使溶液中存在聚苯乙烯等的乳胶珠（直径约 500 纳米），也是一种微细质粒，但不吸收激发光，可测定根据热透镜检测方法的输出。

即使混浊或存在不吸收激发光的微粒也可测定热透镜检测方法的输出这一事实是一个有利条件，当测定存在乳糜的血样中的物质时尤其有利。

如在背景技术部分所描述的一样，血样中乳糜的存在对于在一个很宽的波长范围内的物质的吸光度的测定产生不利影响。因此，必须在两个不同波长处：在作为测定对象的物质的吸收波长处；和在测定混浊度的较长波长处进行测定。以检测乳糜的影响。

另一方面，在热透镜检测方法中，如果进行适当的稀释，这在后面将要描述，则乳糜的存在对测定的不良影响较小。这是因为通过以大约 100 到 3000 赫兹频率截断（开/关）激发光，并仅拾取与截断的激发光同步的探测光的数量上的变化来检测热透镜检测方法的输出。不吸收激发光的混浊使得吸光度的绝对值似乎变大，而时间未发生改变，但它不引起待测样本中同步于截断的激发光的热变化。

为了根据热透镜检测方法测定血红蛋白，需要发现一种方法（测定试剂、反应），以从血红蛋白中产生过氧化氢和之后在过氧化氢的帮助下产

生在长波长处具有吸收带的物质。换句话说，需要发现一种对血红蛋白特异的氧化酶（产生过氧化氢）或改进反应体系，从而使得在背景技术部分描述的血红蛋白自身的过氧化物酶活性被应用到全血的血红蛋白的测定中。如果可以发现这样一种方法，在过氧化氢和过氧化物酶的帮助下可产生 DAOS 和 4-AA 的氧化缩合产物（在长波长处有吸收带的物质）。

然而，上述方法中的任何一种都有很难获得氧化酶或很难利用全血中的血红蛋白的过氧化物酶活性进行定量的问题。结果，当使用价廉的激发光源时，适合使用在长波长处有吸收带的物质，诸如具有血红蛋白自身，即利用高铁血红蛋白。

由于高铁血红蛋白是高度水溶性的，因此不存在在测定时形成沉淀的问题。然而，它不稳定，已经设计它的测定方法以克服这种不稳定性，从而能够稳定地进行定量测定。

下面将进一步详细描述用于测定血红蛋白和 ALP 的方法。

（血红蛋白的吸收波长）

在血液中的大多数血红蛋白是以其结合有氧的二价铁离子的氧合血红蛋白的形式和以没有结合氧的二价铁离子的脱氧血红蛋白的形式存在的，只有很少一部分血红蛋白以高铁血红蛋白的形式，即其被氧化成三价铁离子且不能与氧结合的形式存在。

氧合血红蛋白在 540 纳米和 577 纳米处有吸收带。脱氧血红蛋白在 555 纳米处有吸收带。而高铁血红蛋白它的吸收根据 pH 值而变化，当它的溶液呈酸性时，它在 630 纳米处有吸收带，当它的溶液呈强碱性时，其在短波长范围内有吸收带，并且有增强的红色光。

如上所述，血液中的血红蛋白，仅考虑其氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白具有至少三个吸收带；因此，事实上很难定量全部血红蛋白。所以，在现有技术中，通过首先使血样溶血，然后加入诸如铁氰化钾一类氧化剂使全部血红蛋白氧化成高铁血红蛋白。然而，这样产生的高铁血红蛋白不稳定，因此要加入氰化钾（KCN）或类似物以使得氰离子与血红素铁离子形成配位键，产生稳定的氰化高铁血红蛋白，它在 540 纳米处有吸收带。然后测定在 540 纳米处的吸光度。

然而,如上所述,根据吸收分光光度法很难在微片中对血红蛋白进行定量。优选根据热透镜检测方法进行测定。考虑在POC分析等中使用的方法,优选使用价廉的半导体激光器,而不使用昂贵的气体激光器激发血红蛋白,从而检测热透镜的变化。由于目前从价廉的半导体激光器或发光二极管输出的光的波长是600纳米或以上,因此需要使血液中的全部血红蛋白成为在600纳米或以上具有吸收带的衍生物。

于是本发明的发明者检测了被激发光照射的高铁血红蛋白的吸收稳定性。具体地说,在热透镜检测方法中,作为待测样本的高铁血红蛋白(已进行反应的液体)被装入其光程长度被设置成长达1厘米的小杯中,通过照射微片中的毛细管,测定高铁血红蛋白在与激发光相同的波长处的吸光度。

原则上讲,如果吸光度不稳定,根据热透镜检测方法的吸收也同样不稳定。因此,需要提供稳定且高度准确的吸光度测定,以实施热透镜检测方法。

如后面将要描述的实验实施例1所示,在没有加入氰化钾的情况下使血红蛋白氧化成在630纳米处有吸收带的高铁血红蛋白,然后用具有633纳米波长的激光照射高铁血红蛋白,检测吸光度的变化是否与体积无关。结果,发现可以用在630纳米处有吸收带的高铁血红蛋白定量血红蛋白。

(血样/测定试剂混合比例)

然而,在发明者的重点研究之后,发现当以通常比例(1:250或更多)混合血样和血红蛋白测定试剂以制备待测样本时,根据热透镜检测方法的输出相对于时间有一些不稳定,并随时间而逐渐下降。例如,当混合比例是1:250时,20分钟内在630纳米处的吸光度的下降不超过8.5%,当比例1:415时,为16%;当比例1:1250时,下降至31%,这对于将应用于临床诊断的方法来说准确率太低。

只要所需的准确率相对较低,即使在这种混合比例下也可以进行血红蛋白测定。然而,为了使测定具有高准确率,必须改进混合比例。在经过重点研究之后,发明者发现如果血样和测定试剂的混合比例在1:1到1:250或更小时,可以避免根据热透镜检测方法的输出随时间的变化(下

降)。测定试剂的成分后面将描述。

另外，如果血样与测定试剂的混合比例为 1: 大于 250，例如 1: 500，则很难在准备进行血红蛋白测定的微片中混合它们。原因之一是微片中的测定试剂的储存库太大，因为即使很小量的血样也需要大量的测定试剂。

另外，在微片的狭小的毛细管中很难以 1: 500 的比例均匀地混合血样和测定试剂。因此，需要一个特别的流通过程结构（挡板，搅动等）或极端长的流通过程以实现均匀混合。在这一方面，优选使混合比例保持较小。

根据本发明，优选血样和测定试剂的混合比例是 1: 1 到 1: 250，更优选 1: 1 到 1: 50，最优选 1: 1 到 1: 10。如果混合比例是 1: 小于 1，例如 1: 0.1，则很难提供测定试剂和足以溶血的渗透压，另外，血粘度对于微片内的液体供应的作用也不可忽视。

（测定试剂的成分）

包含于用在本发明的血红蛋白测定方法中的测定试剂内的中性表面活性剂类型没有特别限定为某一种，只要它们具有足以溶解全部红细胞的表面活性能力即可。所用的中性表面活性剂的类型包括，例如，聚氧乙烯醚，如 6-辛基苯氧聚乙氧基乙醇，（例如，Triton X-100，由 Sigma 有限公司生产）；和聚氧乙烯脱水山梨醇（Tween），如聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯（例如 Tween 20，由 ICI 有限公司和 Sigma 有限公司生产）和聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸盐（例如 Tween 80，由 ICI 有限公司和 Sigma 有限公司生产）。

在一些情况下，可以使用阴离子表面活性剂如 SLS 和阳离子表面活性剂，如十六烷基三丁基溴化胺（CTAB）。也可以使用这些离子表面活性剂到这种程度，即它不改变溶血过程中的 pH 值。在书中描述了表面活性剂的详细列表。例如，《表面活性剂手册》，Gower 出版公司的 Ver 2，第 1 和第 2 卷（1997）。

可以以溶血血样中的全部红细胞的量加入本发明的测定试剂。根据本发明的测定试剂以 1: 1 到 1: 250 的比例加入血样中。结果，所得的混

合物中的表面活性剂的浓度优选占重量的 0.5 到 1.1%, 更优选占重量的 0.7 到 0.9%, 最优选占重量的 0.8%。

测定试剂中可用的氧化剂没有特别限定为某一种, 只要它们可以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白即可。然而, 优选使用铁氰化钾。根据本发明的测定试剂以足以氧化血红蛋白的量加入到血样中。

氧化剂浓度的检测结果显示在后面将要描述的实验实施例 1 中。在进行热透镜检测方法中所需的使血红蛋白氧化成高铁血红蛋白的反应, 优选在加入 50 到 10000nmol (绝对量) 氧化剂于 1 微升血样, 更优选加入 100 到 4000nmol (绝对量) 氧化剂到 1 微升血样的条件下进行。

该测定试剂的 pH 值优选在弱酸性到弱碱性的范围内, 以保持高铁血红蛋白在 630 纳米有吸收带。以与实验实施例 1 相同的方式检测在进行热透镜检测方法中所需的用激发光照射高铁血红蛋白后的吸收的稳定性 (以下的描述中称为实验实施例 2)。结果显示 pH 值优选在 4 到 8 范围内, 更优选在 5.0 到 7.0 范围内, 最优选在 5.7 到 6.3 范围内。为了维持上述 pH 值, 普遍使用缓冲液, 诸如磷酸缓冲液 (例如 PBS) 和各种类型的 Good's 缓冲液。

在根据本发明的测定方法中的反应体系的必要条件和反应产物的特征如下:

- a) 反应体系不采用过氧化氢途径;
- b) 反应产物是在价廉的半导体激光波长处有吸收带的色素物质; 和
- c) 反应产物是以相对于激光直径有足够的均匀性的溶液形式存在。

在目前市售的半导体激光器中, 比较便宜的是在大约 635 纳米到 645 纳米或以上的波长处具有吸收带的一些。因此, 在本发明的测定方法中的反应体系优选产生具有上述波长范围内的吸收带的色素物质。

(碱性磷酸酶活性定量)

测定碱性磷酸酶活性的方法包括, 例如, 测定红色醌色素 ($\lambda_{\max}$: 500) 在 600 纳米或以上波长范围内的吸收光谱的方法, 其中红色醌色素是作为苯腈酸的降解产物的酚和 4-AA 的氧化缩合产物, 这些方法还包括直接使用甘油磷酸盐作为底物, 并用甘油脱氢酶和氧化的辅酶 I (以下称为

NAD⁺)还原生成的甘油成为还原的辅酶 I (以下称为 NADH) 和二羟甲基紫罗兰酮(A. Bianchi 等,《生物化学生物生理学方法杂志》(J. Biochem. Biophys. Methods) 28, 35, 1994)

使用含甘油磷酸盐作为底物的反应体系的方法包括,例如,使用 NADH 和四唑盐,特别是由 Dojin 实验室(Dojin Laboratories)生产的 WST 系列作为底物,并向其中加入该反应体系,该反应体系用吩嗪焦亚硫酸盐(以下称为 PMS)或硫辛酰胺脱氢酶活性还原甘油以产生颜色,从而测定该色素在 600 纳米或以上波长处的吸收光谱。

然而,对于测定在 600 纳米或以上波长处具有 500 纳米 $\lambda_{\max}$ 的红色醌色素的方法,在测定磷酸酶活性时分辨率下降。另一方面,使用含甘油磷酸盐作为底物的反应体系被认为肯定有效;然而,由于该反应体系是个多步骤反应体系,它需要优化底物等的反应体系的组合。因此需要进一步检查时期以使用该反应体系作为本发明的测定方法中的反应体系。

用于测定磷酸酶活性并产生在 600 纳米或以上波长范围内具有吸收带的色素的底物包括,例如,日本专利公开号 7-33789 中公开的一种底物。该底物为水溶性磷酸酶底物,具有 644 纳米处的吸收带,并可用于本发明的测定方法中测定 ALP 的底物。然而,它使用起来很不方便。已知的市售底物包括,例如,5-溴-4-氯-3-吲哚氧基磷酸酯(以下称为 BCIP),它被降解以产生在 615 纳米处有吸收带的色素和 3-吲哚氧基磷酸酯以产生在 680nm 波长处有吸收带的色素(生物合成有限公司(BIOSYNTH Co. Ltd.)编著的小册子《底物和试剂》)。

如一个显示本发明的测定方法的效率的实施例一样,将描述 BCIP 作为用于测定 ALP 底物的用途。众所周知,5-溴-4-氯-3-吲哚氧基(以下称为 BCI)被用来利用 ALP 的活性识别基因等的表达,或组织染色中的检测(J. P. Horwitz 等,《医用化学杂志》J. Med. Chem. 9, 447, 1966)。还已知 5-溴-4-氯-3-羟基吲哚的二聚物(以下称为 BCI₂)的水溶性很差,并且很难溶解(J. J. Leary 等,《美国国家科学院院报》(USA), 80, 4045, 1983)。

因此,它自我证明了很难在定量 ALP 活性时以液体状态来测定 BCI。

然而,在经过重点研究之后,本发明的发明者发现优化待测样本中的BCIP浓度,使得本发明的测定方法在用于临床化学中ALP活性测定方面有效。

具体地说,特别规定BCIP的浓度和反应时间,这抑制了具有在大约0.1到1微米或更小直径的BCI2的色素质粒的形成。

更具体地说,根据JCTT通用标准方法制备了缓冲液。特别是制备了1.01M 2-乙氨基乙醇-HCl(Aldrich有限公司)/0.505mM氯化镁的缓冲液(pH9.87))(以下称为缓冲液1)。在测定试剂与血样反应开始前即刻通过溶解作为底物的BCIP于缓冲液1中,得到终浓度为1到15mM,来制备ALP测定试剂(测定试剂)。

这里所用的终浓度意思是指通过将血样与测定试剂混合制备的待测样本中的BCIP浓度。

优选反应时间为3到15分钟,更优选3到6分钟。

(BCIP的溶解度)

作为底物的BCIP在纯水中的溶解度是20毫克/毫升,即,当它以钠盐形式时为54mM(Sigma通用手册, Sigma有限公司)。BCIP在缓冲液1中的溶解度是70mM。为了获得BCIP的最佳浓度,首先通过溶解BCIP于缓冲液1中得到70mM的终浓度来制备ALP测定试剂,然后用缓冲液1一步一步地稀释制备的试剂以分别得到具有70mM、35 mM、15 mM、10 mM、6.25 mM、5 mM、2.5 mM和1.25 mM BCIP终浓度的ALP测定试剂。

关于ALP样本,使用了其制备过程被部分改变的Switrol A(Nissui药物有限公司)。具体地说,通过将一瓶冻干的Switrol A溶于2500微升纯化水(Kyoei Seiyaku有限公司),以得到800IU/l的ALP活性(根据计算值),这被制成储备液。然后用纯化水稀释该储备液以制备具有400IU/l和50IU/l的ALP活性(根据计算值)的溶液,以此来制备ALP样本。

(用吸收分光光度计测定ALP活性)

1000微升ALP测定试剂和25微升上述ALP样本在试管中充分混合,并将该混合物在37°C下精确保持2分30秒。然后将全部反应溶液装入光

程长度为 1 厘米的石英小池中,然后用气体恒温到 37°C 的吸收分光光度计测定在 635 纳米处反应开始后 12 分钟 30 秒内的吸光度。

结果,在具有各种 BCIP 浓度的 ALP 测定试剂的任何一种中都可获得浓度依赖的标定曲线 (calibration curve),它表明可以用吸收分光光度计测定 ALP 活性 (参考图 12)。

(用热透镜检测方法测定 ALP 活性)

1000 微升 ALP 测定试剂和 25 微升上述 ALP 样本在试管中充分混合,并将该混合物在 37°C 下精确保持 2 分 30 秒。然后将全部反应溶液装入光程长度为 50 微米的石英小池中,并将小池放置在气体恒温到 37°C 的台上,用热透镜检测方法测定在反应开始后 5 分钟内的吸光度。

结果,在除了 70mM 和 35mM BCIP 浓度的 ALP 测定试剂以外,可获得浓度依赖的标定曲线,这表明可以用热透镜检测方法测定 ALP 活性 (参考图 10 和图 11)。

因此,发现当使用吸收分光光度法时,可以测定所有 BCIP 浓度的 ALP 活性,但另一方面,当使用热透镜检测方法时,在某些 BCIP 浓度是很难测定 ALP 活性。假定这是由于有色微粒 (色素微粒) 的存在,对于具有各种 BCIP 浓度的 ALP 测定试剂,测定反应产物的粒径分布。

(用激光衍射/散射粒径分布计测定 BCI2 微粒的直径)

将具有 70mM 和 6.25mM BCIP 浓度的 ALP 测定试剂各 25 毫升预热到 37°C。然后以下述方式制备上述 ALP 测定试剂和制备的具有 800IU/1 ALP 活性 (根据计算值) 的标准血清 (血样) 的混合物 (样本 1 到 4)。

首先,通过将具有 70mM 的 BCIP 浓度的 ALP 测定试剂与 2500 微升上述标准血清混合,并使它们在 37°C 下相互反应 3 天来制备样本 1。

然后,通过将具有 70mM 的 BCIP 浓度的 ALP 测定试剂与 625 微升上述标准血清混合,并使它们在 37°C 下相互反应 3 天来制备样本 2。

通过将具有 6.25mM 的 BCIP 浓度的 ALP 测定试剂与 625 微升上述标准血清混合,并使它们在 37°C 下相互反应 3 小时来制备样本 3。

样本 4 是具有 6.25mM 的 BCIP 浓度的 ALP 测定试剂自身 (没有与上述标准血清混合)。

用 HORIBA LA-910 型激光衍射/散射粒径分布计, 根据其手册上的方法测定粒径分布。具体地说, 将样本 1 到 4 各 10 毫升加入到大约 50 毫升纯化水中, 该纯化水装在与上述仪器连接的超声分散槽内, 在这种状态下测定粒径分布。将测定粒径分布所需的相对折射指数设置在 $1.26-0.00i$ 。

测定结果显示存在 BCI2, 它是通过上述反应生成的, 在某些样本中通过各种 ALP 测定试剂与标准血清的混合而获得。它还显示 BCI2 微粒(结晶)大约几百纳米直径(参考图 16)。

另外, 粒径分布测定结果还显示存在几个微米大小的质粒。对于通过较长反应时间制备的样本, 换句话说, 对于通过 3 天反应时间制备的样本 1 和 2 来说, 由于所存在的大多数质粒是几百纳米直径, 所以几个微米直径的质粒被认为是 BCIP。然而, 还不清楚在什么状态下存在 BCIP 质粒。

因此, 适合用于热透镜检测方法中的测定试剂必需不形成作为测定试剂与从活有机体成分中采集的样本的反应产物的色素质粒。另外, BCIP 浓度和 ALP 测定试剂的反应时间必须选择合适。

不用说, 在将测定试剂与从活体成分中采集的样本互相反应之前, 在测定试剂或样本中存在有色结晶如 BCI2 都是不希望的。

(定量乳酸脱氢酶)

当测定乳酸脱氢酶(以下称为 LDH)活性时, 利用 LDH 活性使乳酸和 NAD^+ 转化成丙酮酸盐和 $NADH$, 利用黄递酶活性使 $NADH$ 和 NTB 定量转化成 NAD^+ 和不溶性的二甲脲。并用 0.1N 的 HCl 溶解不溶性的二甲脲, 并测定在 570 纳米处的吸光度。有时用吩嗪焦亚硫酸盐(以下称为 PMS)代替黄递酶。

吸收波长谱表明通过测定在 600 纳米或以上波长范围的吸光度, 可令人满意地测定溶解的色素(不溶性二甲脲)。

另外, 还知道一种方法, 其中应用用于甲脲的水溶性底物来替代 NTB(Munetake Ishiyama, 《临床实验室检验》, 41, 9, 995, 1997)。在由 Dojin 实验室生产的水溶性甲脲中, WST-4 和 WST-5 特别显示具有不随

溶液的 pH 而发生光谱变化的特性 (Munetake Ishiyama, DOJIN News, 82, 10, 1996), 尽管它们的最大吸收波长是 550 纳米, 但其吸收波长谱表明通过测定在 600 纳米或以上的波长范围内的吸光度可进行测定。

WST-1、WST-3 和 WST-8 分别在 438 纳米、433 纳米和 460 纳米处有最大吸收, 在 600 纳米或以上范围内没有吸收波长谱。然而, 在完成上述反应后用碱来增加 pH 值, 使得它们在 600 纳米或以上具有吸收带 (谱位移), 因此, 它们可应用于本发明的测定方法中。

然而, 如果在微片中用强酸或强碱进行 pH 值调节, 或者在微片中用溶剂等溶解不溶性色素, 从而溶解这种不溶性色素并增加光谱位移, 可能引起构成微片的聚合物等的损害, 诸如溶解。这是不希望发生的, 因为这种损害可能引起毛细管的横截面积改变, 从而在毛细管内流动的液体的流速随时间改变。

因此, WST-4 和 WST-5 作为水溶性底物被用于这个定量中。用 WST-4 和 WST-5, 本发明的发明者可显示本发明的测定方法在临床实验室检验测定的 LDH 活性范围内的有效性。

下面将用几个不使用过氧化氢途径的反应体系的实施例显示本发明的测定方法的有效性。

(血中总蛋白质浓度的测定)

没有应用从作为测定对象的物质中衍生出过氧化氢的反应, 而确定血液中总蛋白质 (以下称为 TP) 的浓度的方法包括, 例如, 滴定管比色法。在这个方法中, 在碱性环境中使铜离子与肽链中的氮原子的复合物产生颜色, 并通过测定在 540 纳米到 550 纳米波长范围的吸光度进行测定。

还有一种常用的使用焦培酚红色色素并测定在 600 纳米处的吸光度的方法 (《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。然而, 使用焦培酚红色色素仅能确定低血浓度的总蛋白质, 并且 TP 的确定需要将血液稀释 1000 倍或更多倍。

在微片中可进行定量稀释。然而, 实际上不可能在微片中真正进行 1000 倍或更多倍稀释, 因为提供在微片中用于稀释的储存库需要很大。

发明者检查了用于滴定管比色法中的市售的测定试剂 (Kainos Auto

Series TP Reagent, Kainos 有限公司) 的吸收谱, 发现可通过测定在 635 纳米处的吸光度测定 TP.

(确定血液中尿素氮浓度)

用于测定血液中尿素氮浓度的方法包括, 例如, 双乙酰-肼法、尿素酶/靛酚法、尿素酶/UV 法, 和通过酶促反应产生过氧化氢以用以定量的方法。总的来说, 最频繁使用的是尿素酶/靛酚法(《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。

尿素酶/靛酚法是这样一种方法, 它不使用从作为测定对象的物质生成过氧化氢的反应, 并测定在 570 纳米处的吸光度以进行测定。

本发明的发明者使用用于尿素酶/靛酚法的市售的测定试剂(“用于自动化分析的试剂”, “Seiken”, UN-I, Denka Seiken 有限公司), 并根据尿素酶/靛酚法检查试剂的光谱, 发现可通过测定在 635 纳米处的吸光度检测测定尿素氮。

(血液总胆红素浓度的确定)

常用的用于确定血液中总胆红素浓度的方法包括, 例如, 通过连接偶氮染料和胆红素, 生成偶氮胆红素的重氮法, 和通过用胆红素氧化酶氧化胆红素的酶促方法(《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。

然而, 酶促方法不能被应用于本发明的检测方法中, 因为当胆红素被氧化时, 它使用下降的特定的吸收波长(450 纳米左右)进行测定。

本发明的发明者肯定, 可以通过使用碱性偶氮胆红素方法(测定波长: 600 纳米)测定在 600 纳米或以上波长处的吸光度确定血液中总胆红素浓度。

(γ -GTP 活性的测定)

常用的用于测定血液中 γ -GTP 活性的方法包括, 例如, 对-硝基-N-酰苯胺方法或羧基-对-硝基-N-酰苯胺方法(405 纳米到 415 纳米), 3-羧基-4-羟基-N-酰苯胺方法(410 到 635 纳米), 二甲胺基-N-酰苯胺方法或二乙胺基-N-酰苯胺方法(660 纳米), 和 γ -Glu-DBHA(γ -谷氨酸-二苄基己基胺)方法(600 到 610 纳米)(《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。

然而, 由于反应产物的吸收波长问题使对-硝基-N-酰苯胺方法或羧基-对-硝基-N-酰苯胺方法不能应用于本发明的测定方法中。3-羧基-4-羟基-N-酰苯胺方法、二甲胺基-N-酰苯胺方法或二乙胺基-N-酰苯胺方法, 以及 γ -Glu-DBHA 方法这些是不使用从作为测定对象的物质衍生过氧化氢的反应的方法, 它们可以应用到本发明的方法中。

本发明的发明者肯定 γ -Glu-DBHA 方法适用于本发明的测定方法。

(血液白蛋白浓度的测定)

常用的用于测定血液中白蛋白浓度的方法包括: 例如, 溴甲酚绿方法(以下称为 BCG 方法)或溴甲酚红紫方法(以下称为 BCP 方法)(《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。

这些方法中的任意一种, 通过将色素连接于白蛋白, 从而使白蛋白产生颜色来进行测定。这些方法不使用从作为测定对象的物质衍生出过氧化氢的反应, 并通过测定在 600 纳米或以上的吸收进行检测。

本发明的发明者肯定 BCG 方法适用于本发明的测定方法。

(经过氧化氢途径测定的项目的实施例)

下面将通过几个实施例对本发明的测定方法在应用过氧化氢途径的反应体系中的有效性。

首先, 通过作为测定对象的物质与对该物质特异的酶的反应生成过氧化氢。然后在过氧化物酶活性下, 通过过氧化氢使 4-AA 与色素源发生氧化缩合反应。如果在这一步适当选择色素源, 则可以选择产生颜色的波长。换句话说, 可以测定在 600 纳米或以上波长范围内的吸光度。

下面将描述 8 个具体实施例。

(确定天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶的方法)

关于测定血液中天冬氨酸转氨酶(以下称为 AST)和丙氨酸转氨酶(以下称为 ALT)的方法, 已知的有使用 UV、丙酮酸盐氧化酶(以下称为 POP)-过氧化物酶(以下称为 POD)方法、甲脒比色法, 和 Lightman-Frankel 法(《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。

本发明的发明者肯定通过将市售的用于 POP-POD 方法(TA-LN Kainos:Kainos 有限公司)的测定试剂部分改性后得到的试剂应用于本

发明的测定方法，可确定 AST 和 ALT 的活性。

（用于确定尿酸的方法）

关于确定血液中尿酸的方法，已知的有尿酸酶 POD 法和尿酸酶/过氧化氢酶法（《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997）。

本发明的发明者肯定通过将用于尿酸酶-POD 法的市售的测定试剂（Iatro QUA, Iatron Laboratory Inc.）应用于本发明的测定方法可确定尿酸。

（确定葡萄糖的方法）

关于确定血液中葡萄糖的方法，已知的有葡萄糖氧化酶比色法和 UV 法（《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997）。

本发明的发明者肯定通过将用于葡萄糖氧化比色法的市售测定试剂（Detamina-GL-E, Kyowa 医药有限公司）应用于本发明的测定方法中，可确定葡萄糖。

（确定总胆固醇的方法）

关于确定血液中总胆固醇的方法，已知有胆固醇氧化酶方法等（《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997）。

本发明的发明者肯定通过将用于总胆固醇氧化酶法中的市售测定试剂（HA Test Wako）胆固醇 E-HA Test Wako, Wako 纯化学工业有限公司）应用于本发明的测定方法中，可确定总胆固醇浓度。

〈用于确定 HDL-胆固醇的方法〉

关于测定血液中 HDL-胆固醇的方法，已知的有直接法、葡聚糖硫酸镁/磷钨酸镁方法（《体外诊断集》99' 增补本, Yakuji Nippo Limited, 1999）。

本发明的发明者肯定通过将用于直接法中的市售测定试剂（Choles Test HDL, Daiichi 纯化学有限公司）应用于本发明的测定方法中，可确定 HDL-胆固醇浓度。

〈用于确定 LDL-胆固醇的方法〉

关于测定血液中 LDL-胆固醇的方法，已知的有直接法（《体外诊断集》99' 增补本, Yakuji Nippo Limited, 1999）。

本发明的发明者肯定通过将用于直接法中的市售测定试剂（Chores

Test LDL, Daiichi 纯化学有限公司) 应用于本发明的测定方法中, 可确定 LDL-胆固醇浓度。

(确定中性脂肪的方法)

关于确定血液中中性脂肪的方法, 已知的有酶促比色法(《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。

本发明的发明者肯定通过将用于酶促比色法中的市售测定试剂(“用于自动化分析的试剂”, -HR-甘油三酯-HR, Wako 纯化学工业有限公司) 应用于本发明的测定方法中, 可确定中性脂肪浓度。

(确定肌酐的方法)

关于确定血液中肌酐浓度的方法, 已知的有 Jaffe's 法, 酶比色法, 酶 UV 法等(《体外诊断集》Yakuji Nippo Limited, 1997)。

本发明的发明者肯定通过将用于酶促比色法中的市售测定试剂(L Type Wako, 肌酐 F, Wako 纯化学工业有限公司) 应用于本发明的测定方法中, 可确定肌酐的浓度。

(热透镜检测方法的抗乳糜性)

下面将描述一个实施例, 它显示热透镜检测方法抗几十微米直径的微粒, 例如乳糜的特性, 这种微粒对激发光的波长没有吸光率。

为了定量乳糜的程度, 使用了干扰校验/A Plus (国际试剂公司)。根据本说明书用 Switrol A (Nissui 药物有限公司) 制备有 2100 甲臍度(formazin degree) 的血清(样本), 其通常被认为有大量乳糜。然后, 在使 HA Test Wako 胆固醇 E-HA Test Wako (Wako 纯化学工业有限公司) 与样本反应后, 根据热透镜检测方法和吸收分光光度法(635 纳米) 进行测定。

结果, 可以肯定, 在使用吸收分光光度法时, 乳糜形成背景, 但是在热透镜检测方法中无影响。这一结果表明热透镜检测方法可以抗乳糜。

(激发光和探测光)

当本发明的发明者用具有 633 纳米波长的氩-氟激光作为激发光, 具有 488 纳米波长的氩激光作为探测光时, 可观察到根据热透镜检测方法的输出极端大并随着时间增加的现象, 如后面在参考实施例 1 中将要描

述的一样。

这种激发光和探测光的组合，当测定生物项目如胆固醇时，在从中产生出诸如 DAOS 的色素后，毫无疑问可检测热透镜检测方法的输出。

这是在下列专利中公开的，例如，国际公布号 W099-64846（国际专利申请 PCT/JP99/03158 说明书“用于分析的装置”；日本专利公开号 12-2675（日本专利申请号 10-181587“用于毛细管光热转换分析的装置”）；日本专利公开号 12-2677（日本专利申请号 10-1617603“用于分析的装置”）；日本专利申请号 10-101586（“用于混合分析的装置和方法”）；和日本专利申请号 10-167603（“用于分析的装置”）。

在发明者做过重点研究之后，发现当用分别具有 488 纳米和 633 纳米波长的两种类型的光照射高铁血红蛋白后，产生光学反应，导致异常的输出值。然后，当发明者用波长长于激发光的波长并且不被血红蛋白吸收的激光作为探测光时，用热透镜检测方法可得到正常输出，且可以定量血红蛋白。

作为用于本发明以测定血红蛋白的激发光的光源，需要的是其输出的光具有能够激发高铁血红蛋白以在 630 纳米处有吸收带并足以形成热透镜的波长的光源。根据高铁血红蛋白的吸收，激发光的波长优选 610 纳米到 650 纳米，更优选 630 $\pm$ 10 纳米。光源的类型没有特别限制为某一种，只要它具有足够的光强用于 630 纳米左右的激发即可。

具有所需波长的光可从，例如，使用棱镜的氙灯来获得，然而，当光穿过棱镜其输出降低。

也可使用具有能够激发作为测定对象的物质的波长的激光，或输出足以激发作为测定对象的物质的光的发光二极管。关于激光器，尽管可以使用输出具有 633 纳米波长的光的氦-氖激光器，但半导体激光器适用于 POC 分析等，因为它使得检测装置可以较小。关于半导体激光器，可以使用输出具有 650 纳米波长的光，如由东芝制造的 TDLD 9450MC 型激光器。然而，更优选激发光源包括，例如输出具有 635 纳米波长的光的半导体激光器，如由夏普公司制造的 LT 050MS，由三洋电器有限公司制造的 DL-3088-011, DL-4038-025 等。

如上所述,用于血红蛋白测定中的探测光的波长优选长于600纳米,更优选长于630 $\pm$ 20纳米,即激发光的波长。可使用输出具有1064纳米波长的光的YAG(钇铝石榴石激光器)和在900到1200纳米波长处具有约100振荡线的二氧化碳激光器。然而,更优选输出具有780纳米波长的光,例如,由Nippon Kagaku机械有限公司制造的LDT7830和由三洋电器有限公司制造的DL-4034-151的半导体激光器。也优选使用输出具有830纳米波长的光的半导体激光器,如由三洋电器有限公司制造的DL-7032-001,由夏普公司制造的LT 015PD和由日立有限公司制造的HL 8325G。为了将激发光和探测光都聚光到毛细管内,因此需要一个聚光镜。

当测定非血红蛋白的其它物质时也可使用上面描述的激发光源和探测光源。

由热透镜引起的探测光的变化可用光电二极管,CCD照相机和光电倍增管捕捉到。光电二极管特别适合于微型检测装置。

用截光器等将激发光转变成大约0.1到20msec(频率50赫兹到10000赫兹)的脉冲光,只有同步于截光器频率的探测光的量的变化才用锁定放大器除去。更优选截光器的频率在100赫兹到4000赫兹范围内。

用单功能半导体装置可简化锁定放大器的结构。通过电调制半导体激光器可使激发光转变成脉冲光。在探测光的检测中,普遍使用锁定放大器。然而,也可以使用日本专利公开号9-229883中公开的用于暗场光热转换光谱化学分析仪中的方法。该方法使用遮光板遮挡脉冲光和探测光的光轴附近的光通量,并仅检测由热透镜发散的探测光。

在用探测光检测由用截光器转变成脉冲光的激发光形成的热透镜的变化时,仅仅是探测光的振荡成分(频率与激发光的脉动一致)被检测到。因此,即使由于散射等原因导致光I的绝对量下降,但振荡成分*i*与光I的量的比率没有改变,因此可稳定地获得校正值。

(微片)

用于根据本发明的测定血红蛋白的方法中的微片的结构等没有特别的限定为某一种,只要它具有其内可以流动血样和测定试剂的毛细管即可。

例如,下面将描述的微片是本发明的优选形式之一。具体地说,优选的微片由一对平面构件构成。并且这一对平面构件中至少一个在其表面有一个可允许液体流动的槽。这两个平面构件粘合到一起,使其有槽的表面向内,从而在微片内部形成毛细管。

这样的微片可使用无机材料,如硅和玻璃或有机聚合物构成。然而,在热透镜检测方法中检测部分必须对激发光和探测光都透明。

在使用硅或玻璃作为材料制造微片时,用真空蒸发涂敷等方法在玻璃、石英或硅衬底上形成几百个纳米厚的蚀刻保护膜(Cr(铬)等),然后有这层膜的衬底用旋转器等涂敷一个图形保护层。该保护层用光刻掩模暴露于紫外光下,然后显影(用溶剂除去未处理的部分),之后经图形形成以得到所需的图形。

通过用铁氰化钾等水溶液溶解和除去蚀刻保护膜,用图形保护层作为蚀刻掩模可再次进行图形形成。然后在使用图形保护层和蚀刻保护模作为掩模的同时,用例如氢氟酸水溶液在衬底上蚀刻,以形成槽。在此之后,保护层和保护膜被蚀刻并被除去。可通过激光处理或超声处理在除了上述衬底以外,例如玻璃衬底上也可制作孔洞。

最后,将上面有槽的衬底和上面有孔洞的衬底放在一起,使有槽的表面向内,在例如真空炉内加热(当两片衬底都是玻璃的时,它们要在大约600°C加热几个小时),自然冷却以使它们熔合。就这样制备微片。

当用有机聚合物制备微片时,必须用对测定所用的光透明的树脂,因为微片是用于光学检测的。在根据光热转换检测法进行测定时,适用的树脂是在600纳米到800纳米波长范围内用ASTM D1003测定的透光率为80%或以上,更优选在90%或以上。上述透光率显示该值是通过从100%减去在微片表面的总反射率和有机聚合物衬底自身的吸光率后得到的值。

微片表面的光散射对有机聚合物没有影响,但另一方面,被有机聚合物衬底吸收的光对有机聚合物有影响,使其产生热。因此,当光通过有机聚合物时,产生恰如热透镜这种效应,并成为热透镜检测法的输出的背景,这会引起测定误差。因此,在用于制备微片之前必须估计这种有机聚合物,必须对其透光度范围进行研究,使其中的光对热透镜检测法

无不良影响。

当用吸收分光光度法进行测定时，即使有机聚合物吸收大约 10% 的入射光，光的量仅降低到 90%，这对测定的敏感性无明显影响。然而，当用光热转换检测法进行测定时，即使有机聚合物吸收 10% 或更少的入射光，由于在有机聚合物的微片中形成热透镜，所以测定结果会被明显影响。特别是，当需要高敏感性测定时，即，当作为测定对象的物质浓度较低，并且毛细管狭窄（槽很浅）时，即使有机聚合物仅吸收 1% 或更少的入射光，在某些情况下，即使有机聚合物仅吸收小至 0.5% 或更少的入射光，也可能对测定结果产生不良影响。

例如，假定用包括 50 微米大小的毛细管（即光程长度是 50 微米）的有机聚合物微片对一个物质（液体）进行测定，这种物质在 1 厘米大小的杯中约有 0.1 的吸光度。在光程长度为 1 厘米处有 0.1 的吸光度则对应于在 50 微米大小的毛细管内有 0.103% 的吸光率。如果有有机聚合物微片的有机聚合物部分的容许吸光度（热透镜的形成）高达上述值的 10 倍，吸光率变为 1%，如果它是上述值的 2 倍，则吸光率变为 0.2%。

换句话说，为了根据本发明的方法在测定具有光程长度为 1 厘米时吸光度约为 0.1 的物质，由构成微片的有机聚合物的光的吸收是 1% 或更小，更优选为 0.2% 或更小。

然而，上述值可根据作为测定对象的物质的浓度和毛细管的狭窄度变化。例如，如果通过增加作为测定对象的物质的浓度使 1 厘米大小的小杯中的吸光度增加到大约 0.5，该吸光度相应于 50 微米大小的毛细管内的吸光率为 0.342%。因此，如果有有机聚合物微片的有机聚合物部分的容许吸光度（热透镜的形成）高达上述值的 10 倍，有机聚合物微片的吸光率变为 3.5%，如果它是上述值的 2 倍，则吸光率变为稍小于 1%。

当提供上述配置有槽的平面构件时，可加工性也是在选择树脂类型时的一个重要因素。根据其可加工性来说，所用的比较满意的树脂类型包括，例如，可进行熔化处理的普通热塑树脂和由 UV 固化的树脂。特别适用的一种是可进行熔化处理的热塑树脂，因为可以大量且价廉地生产在表面上有槽的平面构件。在热塑树脂中，无定型热塑树脂、含无定型热

塑树脂作为其主要成分的热塑聚合物合金,或一些具有低结晶性的结晶热塑树脂都比较合适。

对血液的亲合力,特别是不引起聚集、凝固和血小板激活是优选材料的必要条件。

满足上述光透射特性和可加工性,并且特别适合使用的树脂类型包括,例如,苯乙烯树脂,诸如聚苯乙烯、苯乙烯-丙烯腈共聚物;甲基丙烯酸树脂,如聚甲基甲基丙烯酸酯(PMMA)和甲基甲基丙烯酸-苯乙烯共聚物;聚碳酸酯(PC);聚砒;polyetersulfones;polyeterimides;聚丙烯酸酯;和聚甲基戊烯。

1,3-环己二烯聚合物也是适用的。它们可以以均聚物的形式使用。然而,当它们以共聚物的形式使用时,它们可以与化合物形成共聚物,例如,链缀合二烯单体,如1,3-丁二烯、异戊二烯、1,3-戊二烯和1,3-己二烯;乙烯基芳香族单体如苯乙烯、 α -甲基苯乙烯、对-甲基苯乙烯、1,3-二甲基苯乙烯、乙烯萘和乙烯基苯乙烯;极性乙烯基单体如甲基异丁烯酸酯甲基丙烯酸酯、丙烯腈、甲基乙烯基酮和甲基 α -氰基丙烯酸酯;极性单体如环氧乙烷、环氧丙烷、环内酯、环内酰胺和环硅氧烷;或乙烯、-烯炔单体。这种情况下1,3-环己二烯单体/共聚单体的共聚比例优选75/25到100/0。

具有高透光度的环己二烯聚合物在日本专利申请号9-277045和日本专利申请号10-287007中有详细描述。这些聚合物在200纳米波长范围内有很小的吸收。

前述在其上有槽的有机聚合物平面构件可通过下述方法形成,如机械切削面板、用激光等蚀刻处理,UV固化或热固化在模具内的单体或大分子单体,和熔化处理或塑化处理热塑树脂,所用的比较满意的模制处理是熔化处理或塑化处理热塑树脂,因为可以大量且价廉地生产前述平面构件。更适用的模制处理是使用金属模具对热塑树脂进行注入模制、压缩模制或压花模制。

特别是,在用树脂(日本专利公开号10-128783和日本专利申请号10-46665公开的)充填模具腔的过程中,在进行模制处理的同时降低与

金属模具接触的树脂表面的固化温度的一种注入模制类型，可以在高产量的同时以高模制精确率形成具有精细槽的平面构件。这种类型的注入模制的具体实施例之一是在用二氧化碳充填模具的腔时进行。在这种情况下二氧化碳的压力优选是 10MPa 或更小，更优选 0.3 到 2MPa。

在制备用于本发明的微片时，还有另一种优选的注入模制类型是：例如在模制前即刻通过高频感应加热（日本专利公开号 62-58287，美国专利号 4439492 公开的）和在模制前即刻通过辐射加热（Seikei Kako symposia '95, 241 (1995), Seikei Kako, '96, 69 (1996), 《合成树脂》第 42 (1) 卷, 48 (1992) 等）模具的表面进行模制。

其原因是，上述类型的模制方法通过设置模具温度较低，并利用高频感应加热或用热源如卤素灯在模制前即刻选择性地仅仅加热模制表面，使得模制表面瞬态特性和模制周期彼此更协调。

关于用于模制上述微片的金属模具，普遍使用的是用于模制合成树脂的，并且由金属构成的，如铁或以铁为主要成分的钢、铝、以铝为主要成分的合金，锌合金和铍-铜合金都比较合适。

下面将显示生产金属模具的方法的一个实施例。首先用诸如机械切削、蚀刻处理或紫外光熟化的树脂的光蚀刻处理方法，从诸如金属、塑料、硅或玻璃材料制备具有包括期望的精细槽的有机聚合物平面构件的表面结构的基质。然后用电化学浇铸方法从这个基质制造金属模具。

也可用日本专利公开号 6-283830 中公开的方法制造金属模具，用于形成树脂图形。在金属衬底上形成保护层图形之后，其上没有涂敷保护层的部分用金属涂盖法涂敷。然后除去保护层，并在衬底表面形成配置有精细图形的金属板。可以用这个金属板作为金属模具进行树脂和烧结玻璃等的处理。

也可以根据日本专利公开号 6-283830 中公开的生产环形衬底的方法生产用于本发明的有机聚合物微片。

利用玻璃衬底生产微片的方法包括，例如，通过在玻璃衬底上形成保护层图形并用喷沙法处理该玻璃衬底的生产微片的方法。根据该方法，所有飞扬的质粒都由于这个厚保护层而被均匀地垂直定向，因此，与普

通的薄保护层相比,可以更锐利地处理玻璃衬底,并形成具有高形态比例的槽。

另外,还可以使用一种方法,其中通过下列步骤形成微片:用光敏保护层覆盖玻璃或树脂衬底,曝光除槽以外的部分;除去未固化部分以形成槽形式的保护层图形。

另外,可用于本发明的微片也可通过下列步骤产生:用激光等在玻璃衬底上形成贯穿一面到另一面的槽;用两片玻璃平面板将该衬底夹在中间。

另外,本发明可用的微片还可通过下列步骤产生:用激光等在玻璃衬底上形成从一面到另一面的槽;用两片玻璃平面板夹住该衬底。

另外,还可使用一种方法,其中通过下列步骤生产微片:在玻璃衬底上形成保护层图形;用氟化氢等在玻璃衬底上以湿法蚀刻形成槽。

在前述由包括槽的平面构件构成的微片中,槽的内表面可用聚乙二醇等进行防止蛋白质吸收的处理。另外,当使用后面将要描述的电渗流作为液体供应装置时,槽的内表面可进行表面处理以创建稳定的电渗流。

用于本发明的微片优选由两片平面构件构成。两片平面构件中至少其一有上面描述的槽,并且将两片构件放在一起,使有槽的表面向内。然后,使它们经受超声熔化处理、热熔化处理,用粘合剂,如热熔粘合剂和UV粘合剂粘合,粘着剂粘着,或直接加压或经薄弹性片构成整体形成的微片。

没有槽的平面构件(以下称为盖板)的材料可选自用于包括槽的平面构件的材料。而且,也可以使用薄玻璃平面板等。两片平面构件的材料可以相同或不同。平面板的厚度没有特别限制,只要它们不妨碍测定即可。然而,优选在大约0.05到几个毫米的范围内。不论选择的是何种材料,如上所述,重要的一点是在热透镜检测方法中的检测部分的吸光率是5%或更小,优选为1%或更小。

从生产率的观点考虑,本发明所用的微片优选由上述两片平面构件构成。优选两片平面构件中至少其一有槽,并且该微片以这种方式构成,即,使有槽的表面向内将两片构件粘合到一起。然而,也可以用三片平面板以这种方式,即,用两片另外的平面板将上面有孔洞槽的平面板夹

在中间。

上述覆盖平面板上面可提供一个孔洞，用作储存库或可以安装一个圆柱形储存库（包括废液收集器），使得该储存库从中突出。储存库的大小没有特别限制，然而，优选其高度为1到几个毫米，直径为1到几个毫米。当有槽的平面板和覆盖平面板都有几个毫米厚时，上述孔洞也可以作为废液收集器。

本发明所用的流速意思是指在一个固定时间段内在槽（毛细管）内移动的液体的体积。

提供在上述平面板元件的表面，其中有液体流动的槽的轮廓优选是矩形的。然而，该槽也可以是其它多角形的，如三角形、半圆形、半椭圆形或其它形状。微片也可具有由几种不同类型形状的槽的组合构成的流通途径。然而，关于热透镜检测法的检测部分，则槽的轮廓优选矩形。槽的上面（开口端）的宽度可以与下面（底）的宽度相同，或比下面的宽度宽。

如果这个槽太小，可能会由于混合在待测样本中的微粒或血细胞引起堵塞。如果槽太大，当将两种类型的液体混合加入进行混合的效率下降。因此，血液通过的部分需要20到500微米宽，20到1000微米深。优选其为50到300微米宽，30到200微米深。

当在血红蛋白测定过程中溶血血细胞时，溶血操作后的流通途径优选1到1000微米宽，0.1到1000微米深，截面积为1到1000,000平方微米。更优选其为30到1000微米宽，20到1000微米深，截面积为600到1000,000平方微米，且宽度等于或大于深度。

从用于进行分析和测定微量成分这一点考虑，优选在上述平面板元件中的槽的尺寸精确率应该较高。具体地说，槽的尺寸精确率（尺寸变换准确率）优选在宽度和深度为 $\pm 5\%$ 的容许限，截面积的容许限在 $\pm 7\%$ 内，从而在分析时能获得操作准确及可重复性。为了使测定达到高准确，优选槽的尺寸准确率：宽度和深度在 $\pm 2\%$ 的容许限，截面积在 $\pm 4\%$ 的容许限内。

（提供液体的方法）

在本发明中，可以以下述方式在微片内进行定量反应，关于以固定量在测定箱内的血样和所用的测定试剂，在微片内或外使它们混合。或者在微片内的定量反应可以在至少一个固定时间段内以下述方式连续进行。关于以固定比例来混合测定试剂和样本，即通过控制血样与测定试剂的流速比来混合测定试剂和样本，并使它们相互反应（上述日本专利申请号 10-181586，“用于混合分析的仪器和方法”）。

关于液体供应方法，可以使用利用微片外的泵、离心力、或重力作为液体供应装置的方法。

另外，利用通过施加电场到槽（毛细管）内的液体使产生电泳或电渗流来供应液体（Kodansya 出版公司的“毛细管电泳”中详细描述过）。

电渗流是这样一种现象，即毛细管内的液体随着毛细管内表面上的离子运动而移动。当毛细管由玻璃或硅构成时，在玻璃表面的硅酸质子用作驱动力。即使是在微片是由有机聚合物，如 PMMA 和 PC 构成，在毛细管的内表面没有特定的离子种类存在的情况下，根据在毛细管内流动的液体的成分，以使得毛细管的内表面吸收液体内的电解质并利用该电解质的移动的方式产生电渗流现象。为了产生稳定的电渗流，可通过接枝聚合向毛细管的内表面加入具有磺酸基团或羧酸基团的有机聚合物。另外，通过用氢氧化钠等水溶液水解 PMMA 等的表面，在毛细管的内表面形成羧酸基团的方法也是有效的。

在利用电渗流的方法中，可通过控制电压，或根据预先设置的程序以灵敏并适用的方式控制准确的流速。因此，可以高准确率地控制在微片内的反应或分离。在这方面优选该方法。

关于产生电渗流的源，使用高压发生器（例如，HCZE-30PNO 25 型，由 Matsutei 精密有限公司制造，可用电压高达 30kV）。可用外部计算机经接口板（例如，由松下仪器有限公司制造的 DAQCard-1200，CB-50 连接器模块）控制高电压发生器的输出。定时电压应用的程序可以用，例如 NI-DAQ 驱动软件制品（LabVIEW）进行。

可以用重力做为驱动力来提供液体，关于这种液体供应方法，本发明的发明都已经提交了专利申请（日本专利申请号 17-352445）。

(微片中毛细管(通道)的形式)

提供在微片上用于混合或稀释测定试剂和血样的流通途径(毛细管)可采用以下形式,即,单个通道与另一个通道相连,或单个通道与不止一个不同的通道在一点处相连。单一通道与另一通道相连或不止一个不同通道相连以形成单通道的这一形式,使得可进行混合操作和稀释操作。另外,通过改变这些操作中的流速使得可以以不同的比例进行混合和稀释。

当液体供应装置是一个泵时,通过机械改变连接在一起的每个通道的流速可以确定混合或稀释比例。当液体供应装置是电渗流时,通过改变每个通道的截面积或长度,改变向其供应电压的方式,或通过表面处理等改变其中毛细管内表面的电荷状态,可以调节连接在一起的每个通道的流速。

当液体供应装置是离心力时,必须考虑到离中心的距离、转速等来设计每个流通途径。

从混合操作到反应,液体可以连续处理,以及在连续的流通过程中进行测定,而不需要很麻烦地在血样和测定试剂相互反应后,从中收集并测定分离的固定量的液体。

在可以由流速来限定混合比例的方法中,反应不需要连续进行一段较长的时间。例如,如果混合操作化10秒,使血样和测定试剂混合需要至少10秒(通常约20秒,稍微有点多),混合物在足够它们反应的一段时间内移动通过通道,再需要至少10秒用以使该混合物与另一种测定试剂反应。在使混合物经过一段足够它们反应的时间内移动通过通道之后进行测定。

也可以以这种方式,即给微片配置一个测定池(平缓的圆柱体)的方式将血样与测定试剂的混合物提供到热透镜检测装置内,用这个池测定血样和测定试剂并混合它们。

在本发明中,优选2到10分钟继续样本与测定试剂的反应以便混合它们并完成它们的反应。

(实验实施例1:检查血样与测定试剂的混合比例及氧化剂浓度)

检查热透镜检测方法中的一个必要条件, 即测定试剂与血样的混合比例对相对于 633 纳米波长处的激发光的吸光度的效果。关于测定试剂(溶血的氧化剂液体), 所使用的是分别溶解有占重量 0.61mM、10 mM 和 0.8%浓度的铁氰化钾($K_3Fe(CN)_6$)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(以下称为MES)和 Triton X-100 的溶液(pH 6.0)。

关于血样, 所用的是从健康人体采集的肝素化血。当血样与上述测定试剂的混合比例是 1: 250 时, 是将 996 微升上述测定试剂加入到 4 微升血样中; 当混合比例是 1: 450 时, 是将 996 微升上述测定试剂加入到 4 微升用 PBS(磷酸缓冲液)稀释到 60%的血样中; 当混合比例是 1: 1245 时, 是将 996 微升上述测定试剂加入到 4 微升用 PBS(磷酸缓冲液)稀释到 20%的血样中。

(图 1(混合比例是 1: 250), 图 2(混合比例是 1: 415)和图 3(混合比例是 1: 1245)显示了从加入试剂的瞬间吸光度随时间的变化。在加入试剂的瞬间过去 1200 秒(20 分钟)后, 吸光度的下降在混合比例是 1: 250 时为 8.5%, 在混合比例是 1: 415 时为 16.3%, 混合比例是 1: 1245 时为 31%。

当混合比例是 1: 4 时, 即使 800 微升上述试剂加入到 200 微升血样中混合并在室温下静置 5 分钟, 血红蛋白氧化成高铁血红蛋白的反应依然不充分, 如图 4 所示。

然后, 增加测定试剂中氧化剂的浓度, 可得到测定试剂, 其中溶解的铁氰化钾、MES 和 Triton X-100 的浓度按重量计分别为 10mM、12.5 mM 和 1%。

血样 200 微升和氧化剂浓度增加的 800 微升测定试剂相互混合, 5 分钟后测定吸光度。结果, 使得血红蛋白的氧化提高, 如图 5 所示, 图 6 显示了这种条件下混合后 30 秒、10 分钟、20 分钟的吸光谱。在这些条件下, 从加入试剂的瞬间到过去 1200 秒(20 分钟)之后, 吸光度下降 2.9%, 表明吸光度稳定。

(实验实施例 2, 检查 pH 值的影响)

检查所用的溶解有铁氰化钾和 Triton X-100 浓度分别按重量计为

0.61mM 和 0.8%的测定试剂的 pH 值。使用下面所示的用于调节 pH 值的试剂来调节 pH 值。对于 pH 值为 2 和 4, 使用以 NaOH 调节 10mM 柠檬酸缓冲液制备的试剂。对于 pH 值为 6, 则用 10mM MES 缓冲液制备的试剂。对于 pH 值为 8, 则用 10mM 的 TRIZMA 制备的试剂 (Sigma 有限公司)。对于 pH 值为 10, 则用大约 1mM 的 NaOH 溶液制备的试剂。对于 pH 值为 12 的, 则用大约 10mM 的 NaOH 溶液制备的试剂。

图 7 显示了在 633 纳米处的吸光度。当 pH 值为 2、6 和 10 时, 高铁血红蛋白在 630 纳米处有一个吸收峰, 然而它有一个肩峰, 但 pH 值为 4、8 和 12 时, 则无吸收峰。在 700 纳米处的背景吸光度是: pH 值为 2 时是 0.34; pH 值为 4 时是 0.05; pH 值为 6 时是 0.02; pH 值为 8 时是 0.00; pH 值为 10 时是 0.00; pH 值为 12 时是 0.00。

结果, 根据本发明的测定物质的方法, 可以从很小量的样本, 特别是从活有机体成分中采集的极少量样本, 如血液和尿液中测定物质, 例如血红蛋白的浓度。另外, 本发明的方法允许使用具有长波长的激光作为激发光, 因此, 可以价廉地生产热透镜检测装置, 即, 使用这种方法很经济。因此, 本发明的测定物质的方法和用于该方法中的测定试剂适用于 POC 分析等。

另外, 本发明测定血红蛋白的方法使用不含氰化物, 如铁氰化钾, 一种有毒物质的测定试剂。因此, 没有处理废液的麻烦。

附图简述

图 1 是显示待测样本在 635 纳米 (上曲线) 和 780 纳米 (下曲线) 处的吸光度随时间变化的图, 其中待测样本是实验实施例 1 中由血样和测定试剂以 1: 250 的比例制备的;

图 2 是显示待测样本在 635 纳米 (上曲线) 和 780 纳米 (下曲线) 处的吸光度随时间变化的图, 其中待测样本是实验实施例 1 中由血样和测定试剂以 1: 415 的比例制备的;

图 3 是显示待测样本在 635 纳米 (上曲线) 和 780 纳米 (下曲线) 处的吸光度随时间变化的图, 其中待测样本是实验实施例 1 中由血样和测

定试剂以 1: 1245 的比例制备的;

图 4 是显示待测样本的吸光谱的图表, 其中待测样本是实验实施例 1 中由血样和测定试剂以 1:4 的比例混合并使它们反应 5 分钟后制备的(测定试剂中氧化剂的浓度与图 1 到 3 所示的那些一样);

图 5 是显示待测样本的吸光谱的图表, 其中待测样本是实验实施例 1 中由血样和测定试剂以 1:4 的比例混合并使它们反应 5 分钟后制备的(测定试剂中氧化剂的浓度高于图 4 中所示的浓度);

图 6 是显示待测样本的吸光谱随时间变化的图表, 其中待测样本是实验实施例 1 中由血样和测定试剂以 1: 4 的比例混合而制备的(测定试剂中氧化剂的浓度与图 5 中所示的浓度一样), 图(a)显示 30 秒后的变化。图(b)显示 10 分钟后的变化, 图(c)显示 20 分钟后的变化。

图 7 是在实验实施例 2 中在 pH 值是 2、4、6、8、10 和 12 的条件下测定的待测样本的吸光谱的图表。

图 8(a) 是在实验实施例 3 中得到的血红蛋白浓度与热透镜检测方法的输出之间的关系的图表, 图 8(b) 是图 8(a) 的横坐标所示部分的放大图, 其中血红蛋白浓度较低, 横坐标上排用单位 g/dl 表示的数字显示血样中血红蛋白浓度, 横坐标下排用单位 $\mu\text{g/ml}$ 表示的数字显示待测样本中的血红蛋白浓度。

图 9 是显示一个有机聚合物微片中流通途径的几何图;

图 10 是显示根据光热转换检测方法测定玻璃小杯中 ALP 活性的结果的示图。

图 11 是显示在比较实施例 1 中用光热转换检测方法测定的 ALP 活性的结果的 ALP 活性表。

图 12 是显示根据吸收分光光度法测定的 ALP 活性结果的示图。

图 13 是显示实施例 5 中液体供应系统的结构的概略图。

图 14 是显示图 13 的 Perista 泵的结构概略图。

图 15 是显示根据光热转换检测方法对树脂微片中 ALP 活性测定结果的示图。

图 16 是显示 BCI2 粒径分布的测定结果的示图。

图 17 是显示根据光热转换检测法测定的 LDH 活性的结果的示图。
图 18 是显示根据光热转换检测法测定的总蛋白浓度的结果的示图。
图 19 是显示根据光热转换检测法测定的尿素氮浓度的结果的示图。
图 20 是显示根据光热转换检测法测定的总胆红素浓度的结果的示图。
图 21 是显示根据光热转换检测法测定的 γ -GTP 浓度的结果的示图。
图 22 是显示根据光热转换检测法测定的白蛋白浓度的结果的示图。
图 23 是显示根据光热转换检测法测定的 AST 活性的结果的示图。
图 24 是显示根据光热转换检测法测定的尿酸浓度的结果的示图。
图 25 是显示根据光热转换检测法测定的葡萄糖浓度的结果的示图。
图 26 是显示根据光热转换检测法测定的总胆固醇浓度的结果的示图。
图 27 是显示根据光热转换检测法测定的 HDL-胆固醇浓度的结果的示图。
图 28 是显示根据光热转换检测法测定的 LDL-胆固醇浓度的结果的示图。
图 29 是显示根据光热转换检测法测定的中性脂肪浓度的结果的示图。
图 30 是显示根据光热转换检测法测定的肌酐浓度的结果的示图。
图 31 是显示根据光热转换检测方法对有乳糜的样本进行总胆固醇浓度测定的结果的示图。
图 32 是显示根据吸收分光光度法对有乳糜的样本进行总胆固醇浓度测定的结果的示图。

实施本发明的最佳模式

(实施例 1)

在使用氦-氖激光器作为激发光源的热透镜检测方法测定血红蛋白中,检测了在血样稀释度和热透镜检测方法的输出之间的线性关系。这将描述如下。

光热转换检测装置的结构如下。出于方便从载物台上操作待测样本的考虑,所用的显微镜为倒置显微镜(由 Olympus 光学有限公司制造的 IX 70)。也可以使用发射显微镜。这个显微镜被改进,以使得可以引入由显

显微镜外的光学系统形成的同轴激光。

关于激光器，使用的是氩-氦激光（633 纳米，10m W，由 Edmont 科技有限公司制造）用作激发光，半导体激光器（780 纳米，由 Nippon Kagaku 工程有限公司制造的 LDT 783）用于检测（探测光）。关于所有光学系统，如反光镜和光束放大器，使用由 Mesglio 有限公司制造的产品。

在由截光器调制后，用于激发的激光由分光镜形成为与用于检测的激光同轴，然后被引入到将用于待测样本的显微镜。在用于激发的激光被引入待测样本后，只有脱离于同轴的激光之外的激发光被滤光镜选择性除去并引入到光感受器。对于激光接收部分的元件，考虑的便于操作，使用有纤维的光传感器放大器（由 Hamamatsu 光学有限公司制造的 c6386）。这个光传感器的光接收部分用一个具有针孔的盖板卷起。用低噪前置放大器（由 NF 电路块有限公司制造的 LI-75A）放大从光传感器和传感器放大器的输出。之后引入到锁定放大器以接收信号处理。

用这种热透镜检测装置以下列方式检测血样稀释度和血红蛋白的定量能力之间的关系。

从健康人体采集的加有肝素的血（血红蛋白浓度为 16g/dl）用作血样。关于测定试剂，使用分别溶解有占重量 8 mM，10 mM 和 0.8%浓度的铁氰化钾，MES 和 Triton X-100 的溶液（pH 6.0）。

当待测样本中血红蛋白（Hb）的浓度是 6400 微克/毫升时，将上述测定试剂 960 微升加入到 40 微升血样中，混合（混合比例 1: 24），然后在室温下静置 5 分钟或更长一段时间，之后用热透镜检测方法测定。当待测样本中血红蛋白的浓度是 640 微克/毫升时，将 996 微升测定试剂加入到 4 微升血样中，混合。当待测样本中血红蛋白的浓度是 384 微克/毫升时，将 996 微升测定试剂与用 PBS 稀释到 60%的 4 微升血样中混合；当待测样本中血红蛋白的浓度是 128 微克/毫升时，将 996 微升测定试剂与用 PBS 稀释到 20%的 4 微升血样中混合；

将用这种方式得到的每种待测样本放入到平板玻璃小杯中，该小杯具有 50 微米深，几毫米宽的槽（由 GL 科技有限公司制造的石英池型 AB 20-SQ-0.05），然后将这个小杯放在倒置显微镜的载物台上：关于这个小

杯, 作为具有复杂的槽图形的微片的模型变体, 采用宽度几乎与微片宽度一样深的小杯。在热透镜检测方法中, 槽的宽度需要几十微米或更大, 即使槽继续加宽, 也不会有明显的问题 (然而, 它可能对在槽内的弥散混合等有影响)。在由树脂等构成的微片中, 槽的深度受到用于模制的基质产品的限制, 并对热透镜检测法的敏感性有显著影响。因此, 用于这个实施例中的平板玻璃小杯的槽的深度被制成与后面将描述的微片的几乎一样。

使用激发的激光用于物镜的聚焦。换句话说, 参考监视屏, 在玻璃小杯的槽的边缘进行聚焦。并且, 之后几乎在槽的中心进行热透镜检测。

由截光器将激发激光调制成 3289Hz, 以激发高铁血红蛋白产生热。由截光器调制的这个频率可根据 S/N 比例等的影响而改变。由这个热的生成产生的热透镜使检测激光的聚焦位点位移, 从而使由光传感器通过针孔接收到的光的量根据产生的热的量而变化。用锁定放大器来处理光传感器的信号, 但是在这种情况下, 用 1 秒作为时间常数, 仅使用与截光器有一样的 3289Hz 频率的信号。

图 8 显示了该结果。纵轴代表热透镜检测方法的输出强度 (mV), 横轴的上部分代表血样中血红蛋白的浓度, 横轴的下部分代表在与测定试剂混合后待测样本中的血红蛋白的浓度。

(实施例 2)

使用由有机聚合物构成的微片, 用 635 纳米长的半导体激光作为激发光进行血样中的血红蛋白的测定。描述如下:

其表面有槽的构成微片的平面构件通过注入模制形成。用于注入模制的树脂是甲基丙烯酸树脂 (由 Asahi Kasei 工业有限公司生产的 Derpet 80NH)。关于气体, 使用纯度达 99% 或更高的二氧化碳, 它的压力设置为 1MPa, 关于模制机器, 使用由 Sumitomo Juki 有限公司制造的 SG 50。模制的物品是厚度为 2 毫米, 长 120 毫米及宽为 60 毫米的平面构件。

在这个平面构件的表面提供有宽 100 微米, 深 50 微米, 长 3 厘米的线性槽。并且, 在这个槽的两端, 各提供一个环形槽 (直径 3 毫米, 深度为 50 微米), 以提供用于放入和取出待测样本的孔洞。这个环形槽中

用钻等钻出一个直径 2 毫米的孔洞以提供放入和取出待测样本的部分。

另外,关于进行模制的基质,可使用以 RIE 法蚀刻硅氧烷获得的,和用 DFR(干模保护层)法光固化硅氧烷获得的基质。在该基质经电铸以制备冲模之后,通过注入模制形成平面构件,将这些构件与这两种基质相比,从这两种基质可以获得几乎一样的模制物品。

同样,通过利用光学显微镜进行观察来评估该基质表面条件的可传递性,并用激光显微镜进行形状测定。同样,通过利用光学显微镜观察模制的物品,用光学显微镜和电子显微镜观察截面中的槽的形状,用激光显微镜等检测形状。

具有 200 微米厚度、涂覆有光固化粘合剂的甲基丙烯酸树脂片与以这种方式获得的表面有槽的平面构件粘合。然后,向它的上面施加 UV 光,以形成仅在两端开口的毛细管,这个毛细管用作用于测定的微片。

关于光热转换检测装置,原则上使用实施例 1 描述的装置。然而,用于激发光的激光器从 633 纳米的氦-氖气体激光器换成 635 纳米激发的半导体激光器(由三洋电器有限公司制造的 DL-4038-025),光学系统也作相应调整。

关于待测样本,使用通过将血样和测定试剂混合并相互反应获得的待测样本。所述血液是从健康人体采集并加有肝素的血液(血红蛋白浓度为 16 克/分升),所述测定试剂是溶解有分别占重量 8 mM, 10 mM 和 0.8% 浓度的铁氰化钾, MES 和 Triton X-100 的溶液(pH 6.0)。

即,使用分别以下述方式获得的样本,当待测样本中血红蛋白的浓度是 6400 微克/毫升时,将上述测定试剂 960 微升加入到 40 微升上述血样中,混合,当待测样本中血红蛋白的浓度是 640 微克/毫升时,将 996 微升测定试剂溶液加入到用 36 微升 PBS 稀释的 4 微升血样中并混合。然后将它们在室温下静置 5 分钟或更长一段时间。

2 微升这些待测样本(样本血的含量为 40nl 和 4nl)从以上述方式制备的微片的孔洞引入到毛细管内,以测定热透镜检测方法的输出。结果,血红蛋白浓度为 640 微克/毫升检测到约 0.5 mV 的输出,血红蛋白浓度为 6400 微克/毫升检测到约 5 mV 的输出。

(实施例 3)

下面将描述通过混合血样和测定试剂并使它们相互反应以制备待测样本，并根据热透镜检测方法在由有机聚合物构成的微片中进行待测样本中血红蛋白检测的情况。

关于光热转换检测装置，使用与实施例 2 一样的装置。

同样，以与实施例 2 相同的方式制备微片。首先，通过注入模制形成与图 9 中所示的一样的表面有槽的 PMMA 构成的平面构件 31。平面构件 31 的外径与实施例 2 的相同。在这个平面构件 31 的环形槽 1、2 中用钻钻出直径 1 毫米的孔洞，以提供用于装入和取出血样与测定试剂的部分。同样，在环形槽 3 也钻出一个类似的孔洞以提供用于放入废液的部分。

具有 200 微米厚度的并涂覆有光固化粘合剂的甲基丙烯酸树脂片与以这种方式获得的有孔洞的平面构件 31 的有槽的表面结合。然后，向它们施加 UV 光以形成仅在两端有开口的毛细管，该毛细管用作测定所用的微片。

图 9 显示形成的毛细管的通道的几何图。在通道的末端提供有血样库 1、测定试剂库 2 和废液库 3，除了它的孔洞部分以外，库 1、2 和废液库 3 的直径都是 3 毫米，深度是 50 微米。

所有的毛细管（通道）都具有 50 微米深，150 微米宽，且通道 11 的长度为 9 毫米，通道 12 的长度为 9 毫米，通道 13 的长度为 65 毫米。光热转换检测法（热透镜检测法）的检测部分 21 提供在通道 13，通道 11 和通道 12 的汇点 22 与检测部分 21 之间的距离是 60 毫米。

关于测定试剂，使用溶解有分别占重量 8 mM，10 mM 和 0.8% 浓度的铁氰化钾，MES 和 Triton X-100 的溶液（pH 6.0）。关于血样，可使用从健康人体采集的加有肝素的血样（血红蛋白浓度为 16 克/分升）和通过用 PBS 稀释使血红蛋白浓度调节到 10 克/分升的上述血样。

用 25 微升微量注射器（由 Hamilton 有限公司制造）取 4 微升血样，并且该微量注射器用特氟隆管连接到血样库 1 的孔洞。同样用另一个微量注射器取 20 微升测定试剂，该微量注射器通过另一个特氟隆管连接到测定试剂库 2 的孔洞。

两个微量注射器分别安装到两个微量注射器泵上（由 Harvard 有限公司制造），设置每个微量注射器泵，使得血样流速为 0.2 微升/小时，测定试剂流速为 4.8 微升/小时。结果，血样和测定试剂的混合比例是 1:24。在将它们混合相当于它们流过图 9 的通道 13 所用的时间段后的反应时间大约是 5.4 分钟。

在室温下，驱动上述两个微量注射器泵以测定由热透镜检测法的输出。结果，当血样中血红蛋白浓度为 16 克/分升时，可获得约 4.0mV 的输出；稀释的血样中血红蛋白的浓度调整为 10 克/分升时获得的输出约为 2.5 mV。

（参考实施例 1）

除了用在 488 纳米处有激发光的氩激光器作为探测光的光源外，以与实施例 1 相同的方式进行血红蛋白的测定。

关于血样，用从两个健康人体采集的加有肝素的血液（血红蛋白浓度为 16 克/分升）作为样本 1 和 2。这些血样用 PBS 稀释使其浓度分别为 60%和 20%，该稀释的样本被定以为 0.6 ×样本和 0.2 ×样本。996 微升溶解有分别占重量 0.61mM, 10 mM 和 0.8%浓度的铁氰化钾，MES 和 Triton X-100 的溶液（pH 6.0）加入到 4 微升这些稀释的样本或未稀释的血样（1 ×样本）并使其混合，在室温下静止 5 分钟和更长时间，之后用热透镜检测法进行检测。

这些结果显示在表 1。另外，表 1 的结果代表在减去背景后的热透镜检测法的输出。

从结果可明显看出，总的来讲，热透镜检测法的输出不稳定。特别是，稀释样本可得到异常高的值。这些现象在前述实施例中未发现。

这种现象的原因是，可认为是由于在 633 纳米的激发光和 488 纳米的探测光在同时应用这一事实，引起血红蛋白的许多激发状态，以产生光反应样的激发状态聚集，或血液内的其它成分吸收 488 纳米的光与血红蛋白相互作用。然而，确切原因还没有完全搞清楚。

表 1

	样本 1	样本 2
稀释到 20%	200 到 300mV	在 10 分钟内从 3 mV 增加到 250 mV
稀释到 60%	2 到 6 mV	从 3 mV 逐渐增加到 6 mV
未稀释	6 mV 不稳定	在 3.1 mV 处较稳定

(实施例 4)

本发明的一个实施例显示了由光热转换检测法定量血清 ALP 活性的结果。

(光热转换检测系统的结构)

关于光热转换检测系统 (光热转换检测仪器), 使用了与实施例 1 的基本结构相同的系统。下面描述了用光热转换检测系统测定除血红蛋白以外的物质的一般测定方法。

将一个有槽图形 (或包含待测样本的玻璃小池、玻璃池深度为 50、100、200 和 500 微米) 放置在倒置显微镜的载物台上。关于聚焦物镜, 参考监视屏用激发激光在槽图形的上和下缘的位置进行聚焦, 之后设定其中间位置为槽的中间位置。

在完成聚焦后, 进行上述样本和测定试剂之间的反应, 以引导含反应产物的溶液到检测部位。用截光器调制激发激光成为 1170Hz 以激发在槽内的反应产物产生热。由截光器调制的频率可根据 S/N 的比例等的影响而变化。

由热发生产生的热透镜使检测激光的聚焦位点位移, 从而使由光传感器通过针孔接收到的光的量根据产生的热而变化。测定期间, 待测样本可以流动和停止流动, 但在该实施例中, 是在样本停止流动的情况下进行测定。锁定放大器处理来自于光传感器的信号, 但是在这种情况下, 用 1 秒作为时间常数, 仅选择使用那些具有与截光器频率, 1170Hz 相同的频率的信号。由于锁定放大器的输出电压与由激发光激发的反应产物的浓度成比例, 从而可以定量反应产物。

(测定试剂的制备)

根据 JSCC 标准法, 以与上述相同的方式制备缓冲液。然后, 将 BCIP

(由 Wako 纯化学有限公司生产) 溶解于缓冲液 1 中作为底物, 从而得到 30、15 和 7mM 的终浓度以制备 ALP 测定试剂 (测定试剂), 这是在测定试剂与样本反应前即刻配制的。

(样本: 标准血清的制备)

关于样本, 使用的是 Switro A (Nissui 制药有限公司), 其中部分制备方法已被改变。具体地说, 一瓶冻干产品溶于 2500 微升纯化水 (Kyoei 制药有限公司), 从而得到 ALP 活性是 302IU/L (计算值) 以制备备用液。然后, 用纯化水稀释备用液以制备具有 101IU/L 和 51IU/L (计算值) 的 ALP 活性的溶液。并且, 这些溶液和纯化水本身用作样本。

(ALP 活性的检测)

1000 微升 ALP 测定试剂和 25 微升样本在试管内充分混合, 并被热保温在 37°C 精确定时 2.5 分钟。之后, 将混合溶液 (待测样本) 装入有 50 微米深的槽的平板玻璃小杯 (由 GL 科技有限公司制造的石英池型 AB20-SQ-0.05) 中, 将这个小杯放置在倒置显微镜的载物台上, 载物台连接有 37°C 的气体恒温器。以锁定放大器的输出值作为指示器, 随着显示最高值的位置来聚焦物镜。

用前述软件 Lab VIEW 处理测定开始后约 15 分钟由热透镜检测法的输出。即, 得到的曲线用线性回归处理, 通过定义由回归形成的曲线的斜率为每秒产生的反应产物的量进行定量。同时, 通过气体热保温显微镜的载物台使小杯保持在 37°C。从上述测定获得的结果见图 10。

(比较实施例 1)

本发明的一个比较实施例, 显示了由于出现不溶性物质 (BCI) 的沉淀而导致很难进行热透镜检测法测定的情况。

(光热转换检测系统的结构)

光热转换检测系统具有与实施例 4 相同的结构。

(测定试剂的制备)

以与实施例 4 相同的方式制备试剂。然而, BCIP 浓度是 70mM。

(样本的制备)

以与实施例 4 相同的方式制备样本。然而, ALP 活性是 800IU/L。

（检测 ALP 活性）

以与实施例 4 相同的方式进行检测。结果，对于 BCIP 浓度为 70 mM 的 ALP 测定试剂来说，不可能获得热透镜检测方法的稳定的输出，因此无法确定反应的量，如图 11 所示。与此相反，对于 BCIP 浓度为 15 mM 的 ALP 测定试剂，可获得在整个时间内逐渐稳定化的热透镜检测法的输出。

同样，保持 BCIP 浓度为 70 mM 的 ALP 测定试剂在 4°C 的冷却状态，结果可发现 BCIP 重结晶。这一现象在 BCIP 浓度为 35 mM 的 ALP 测定试剂中也被发现，但在 BCIP 浓度为 15 mM 或更低的 ALP 试剂中没有发现该现象。

从这一点来看，可以认为热透镜检测法输出的不稳定性是由于有色微晶的形成，而微晶引起散射这一事实。

（比较实施例 2）

在一个比较实施例中，将描述即使有不溶性物质（BCI）的微晶形成也能够进行吸光度测定的情况。关于 ALP 测定试剂和样本，使用以与实施例 4 相同的方式制备的那些。对于分光光度计，使用由 Shimadzu 公司制造的 UV2000。结果，即使是 BCIP 浓度为 70 mM 的 ALP 测定试剂也可获得标定曲线，如图 12 所示。

（实施例 5）

使用具有毛细管（槽）的由树脂构成的微片在控制 ALP 测定试剂和样本的流速的同时定量 ALP 活性。液体输送和流速通过驱动经由导管连接到储存库的微量注射器，利用微量注射器泵和由注射器泵改造构成的一系列彼此相连的微量蠕动泵（peristaltic pump）来机械控制。

（微片的制备）

以几乎与实施例 3 相同的方式制备微片，所形成的平面构件 31 是 120 毫米长，80 毫米宽，5 毫米厚，并具有提供在上面形成与图 9 所示的微片的槽形相似的图形。

用钻在液体储存库 1 到 3 中钻出两个直径 1.5 毫米的孔洞。液体储存库 1 用于样本，液体储存库 2 用于测定试剂，液体储存库 3 用于废液。

另外, 如果用两种类型测定试剂进行测定, 则使用在槽 13 的汇聚点 22 和检测部分 21 之间的适当位置另有一个液体储存库 4 的图形的微片。

所有的槽都具有 50 微米深, 而至于槽的宽度和长度, 槽 11 为宽 50 微米, 长 5 毫米; 槽 12 为宽 50 微米, 长 5 毫米; 槽 13 为宽 100 微米, 长 9 毫米。利用溶于甲基丙烯酸酯单体内的以丙烯酸为基础的光固化粘合剂将具有 300 微米厚度的甲基丙烯酸树脂片与具有槽的该平面构件 31 的表面相结合。

然后, 在一次性注射器针头的距离基部约 3 毫米的位置切断以除去尖端, 从而制备外部圆锥形液体储存库。该外部液体储存库的内径为 4 毫米, 高 10 毫米。三个外部储存库以这样一种方式, 即这三个库分别与液体库 1 到 3 相连的方式粘合到平面构件 31。这样就形成了微片。

(液体传输系统的结构)

图 13 显示了包括微量注射器 41、注射器系 40 和由改进的注射器系构成的蠕动泵 50 的液体传输系统。同样, 图 14 显示了蠕动泵 50 的结构的系统的示图。

固定于注射器系 40 (由 Harvard 有限公司制造) 的微量注射器 41、41 (由 Hamilton 有限公司制造 (容量为 500 微升)) 的尖端通过乙酸乙烯酯管 42、42 (内径 350 微米) 连接到固定于蠕动泵 50 上的蠕动管 51、51 (内径 250 微米) 的一端。蠕动管 51、51 通过 SUS 管 52、52 连接到与微片 60 的液体储存库 1、2 相通的两个外部液体储存库 61、61。

在蠕动泵 50 中, 经由管止动销 55 固定于蠕动泵 50 上的蠕动管 51 夹在辊 53 和铝平板 54 之间。辊 53 沿蠕动管 51 的纵向移动, 从而在蠕动管 51 内的液体被推向聚合物微片 60。

由于这种结构, ALP 测定试剂和样本在控制它们的流速的情况下从微量注射器 41 被传送到微片。

(光热转换检测系统的结构)

关于光热转换检测系统 (光热转换检测装置), 使用与实施例 1 基本结构相同的系统。然而, 用于激发光的激光器由 633 纳米的氦-氖气体激光器换成 635 纳米发射的半导体激光器 (由三洋电器有限公司制造的

DL-4038-025)。光学系统也随着这个改变作相应调整。

(测定试剂的制备)

以与实施例 4 相同的方式制备试剂, 然而, BCIP 浓度为 15mM。

(样本: 标准血清的制备)

关于样本, 使用其制备过程被部分改变的 Switrol A(Nissui 药物有限公司)。具体地说, 通过将一瓶冻干的产品溶于 2500 微升纯化水(Kyoei 制药有限公司), 以得到 ALP 活性为 350IU/1 (根据计算值) 以制备备用液。然后该备用液用纯化水稀释以制备具有 175IU/1 和 100IU/1 的 ALP 活性(根据计算值)的溶液。另外, 20 微升上述两种溶液与 20 微升纯化水和 480 微升缓冲液 1 混合, 所得的溶液用作样本。在每种溶液中加入少量(0.1vol%)用于检查流速的 0.5 微米直径的乳胶珠(由 Otsuka 电器有限公司制备的用于平面样本(plane samples)的细胞(cell)检测微粒)的悬液。

(ALP 活性的检测)

使用注射器等, 手动将测定试剂注入到液体储存库 1, 将样本注入到液体储存库 2 中。将承载有两种液体的微片 60 放置在倒置显微镜的载物台上, 载物台上固定有 37°C 的气体恒温器。

然后, 通过 SUS 将微片 60 的液体储存库 1 和 2 连接到固定于蠕动泵 50 的蠕动管 51, 以完成具有图 13 所示结构的液体传输系统。

通过驱动注射器系 41, 将测定试剂和样本以 600 微升/小时的流速流动大约 3 分钟, 以将上述两种液体引入到微片 60 的毛细管内, 之后, 关停注射器系 41, 以与实施例 4 相同的方式测定 ALP 活性。结果可获得图 15 所示的标定曲线。

(实施例 6)

(粒径分布的测定)

通过混合 ALP 测定试剂和样本(样本来源于生物成分)获得的待测样本中可能存在微晶。测定这种微晶的粒径分布, 其结果描述如下:

以下述方式通过分别将 BCIP 浓度为 70mM 和 6.25 mM 的 ALP 测定试剂 25 毫升与制备的使得 ALP 活性计算值为 800IU/L 的标准血清(样本)混

合制备样本（样本 1 到 4）。

首先，样本 1 是通过将 2500 微升标准血清与 BCIP 浓度为 70mM 的 ALP 测定试剂混合，并使该混合物在 37°C 下反应三天得到的样本。

然后，样本 2 是通过将 625 微升标准血清与 BCIP 浓度为 70mM 的 ALP 测定试剂混合，并使该混合物在 37°C 下反应三天得到的样本。

另外，样本 3 是通过将 625 微升标准血清与 BCIP 浓度为 6.25mM 的 ALP 测定试剂混合，并使该混合物在 37°C 下反应三小时得到的样本。

再者，样本 4 是仅有 BCIP 浓度为 6.25mM 的 ALP 测定试剂（没有混入标准血清）。

使用 HORIBA LA-910 激光衍射/分散型粒径分布测定仪作为测定仪器进行粒径分布的测定。具体地说，将样本 1 到 4 各 10 毫升分别加入到固定于包含 50 毫升纯化水的上述测定仪上的超声分散浴槽内进行测定。作为粒径分布的测定条件的相对折射指数设置在 1.26 到 0.00i。

图 16 显示了测定结果。在通过将 ALP 测定试剂与标准血清混合并使该混合物反应得到的测定试剂中，存在作为上述反应结果的 BCI2 的生成。并且发现 BCI2 的质粒（微晶）具有大约几百个纳米直径。

同样，从粒径分布的测定结果显然可以看出还存在几微米大小的质粒。然而，由于在经过较长小时的反应得到的样本，即在反应三天后得到的样本 1 和 2 中以几百个纳米大小的质粒为主，可以认为具有几微米大小的质粒是 BCIP。然而，BCIP 质粒存在的状态还不清楚。

因此，对于适合热透镜检测法的测定试剂，应该不会产生作为在测定试剂与来源于生物成分的样本之间的反应产物的色素质粒。另外，ALP 测定试剂的 BCIP 浓度和反应时间也要合适。

另外，不用说，在测定试剂和来源于生物成分的样本反应之前存在诸如 BCI2 质粒的微晶自然是不优选的。

（实施例 7）

本发明的一个实施例，将描述定量血清中 LDH 活性的结果。另外，用光热转换检测方法在由树脂构成的微片中进行测定。

（光热转换检测系统的结构）

关于光热转换检测系统（光热转换检测装置），使用的是与实施例 1 中的基本结构相同的系统。然而，用于激发光的激光器从 633 纳米的氦-氟气体激光器换成 635 纳米处发射的半导体激光器（由三洋电器有限公司制造的 DL-4038-025）。相关的光学系统也随该变化作相应的调整。

（测定试剂的制备）

使用作为测定试剂盒的 LDH Kainos（由 Kainos 有限公司生产）来制备测定试剂。

即，2, 2'-二苯并噻唑基-5, 5'-2[4-二（2-磺乙基）氨基甲酰基苯基]-3, 3'-(3, 3'-二甲氧基-4, 4'-双亚苯基)二四唑啉二钠盐（由 Dojin 实验室制备的 WST-5）加入到 LDH Kainos，由此除去为一着色色素的 NTB。更具体地说，将 0.5mM WST-5 溶于 16 毫升 LDH Kainos 中（底物缓冲液），从中除去 NTB，然后将反应试剂溶于其中以提供测定试剂。

（样本：标准血清的制备）

关于样本，使用的是其部分制备过程已被改变的 Switro A（Nissui 制药有限公司）。具体地说，一瓶冻干产品溶于 5 毫升纯化水（Kyoei 制药有限公司），从而得到 LDH 活性为 700WU（计算值）以制备备用液。然后，用纯化水稀释备用液以制备 LDH 活性分别为 400WU 和 100WU（计算值）的溶液。另外，这些溶液和纯化水本身用作样本。

（LDH 活性测定）

以与实施例 5 相同的方式进行 LDH 活性测定。结果，可获得如图 17 所示的标定曲线。

（实施例 8）

（TP 的测定）

关于测定试剂，根据其说明书使用 Kainos 自动系列 TP 试剂（Kainos 有限公司）。

关于样本，使用其制备方法被部分改变的 Switrol A（Nissui 制药有限公司）。具体地说，一瓶冻干产品溶于纯化水（Kyoei 制药有限公司）

中使得 TP 浓度为 9.75g/dl, 7.5g/dl 和 5.0g/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是与实施例 4 的结构类似的装置。并且, 上述样本和上述测定试剂根据上述测定试剂的说明书混合并相互反应。之后, 将待测样本装入具有 50 微米深的槽的平板玻璃小杯(由 GL 科技有限公司制造的 Quartz Cell Type AB20-SQ-0.05)中, 并将这个小杯放在倒置显微镜的载物台上。以显示最高值的位置作为指示器, 根据锁定放大器的输出值进行物镜的聚焦。用前述软件 LabVIEW 处理这个最高值, 以测定 TP 浓度。结果, 可获得图 18 所示的标定曲线。

(实施例 9)

(尿素氮的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用用于自动分析“Seiken” UN-I(Denka Seiken 有限公司)的试剂。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水(Kyoei 制药有限公司)中使得尿素氮浓度为 99.4mg/dl, 24.9mg/dl 和 6.2mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是与实施例 4 中结构类似的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定尿素氮。结果, 可获得图 19 所示的标定曲线。

(实施例 10)

(总胆红素的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用用于总胆红素测定的 HA Test Wako 总胆红素 II-HA Test Wako(Wako 纯化学工业有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水(Kyoei 制药有限公司)中使得总胆红素浓度为 1.68mg/dl, 0.4mg/dl 和 0.1mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是与实施例 4 中结构类似的装置。并

且, 以与实施例 8 相同的方式测定总胆红素。结果, 可获得图 20 所示的标定曲线。

(实施例 11)

(γ -GTP 活性的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用 γ -GTP Kainos (Kainos 有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司) 中使得 γ -GTP 活性为 121 IU/l, 80 IU/l 和 40 IU/l (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定 γ -GTP 活性。结果, 可获得图 21 所示的标定曲线。

(实施例 12)

(白蛋白的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用白蛋白试剂/A(Kokusai Siyaku 有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司) 中使得白蛋白浓度为 7.0g/dl, 4.71g/dl 和 2.35 g/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定白蛋白浓度。结果, 可获得图 22 所示的标定曲线。

下面将参考参考实施例 2 到 9 对各种物质的测定的实施例进行描述。

(参考实施例 2)

(AST 活性的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用的是 TA-LN Kainos (Kainos 有限公司)。然而, 该测定试剂包含 DAOS (Dojin 实验室) 替代通常包含于 TA-LN Kainos 内的 TOOS。它的浓度与通常试剂所包含的 TOOS 的浓度相

同。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司) 中使得 AST 活性为 238KU, 33.6KU 和 1.7KU (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 4 相同的方式测定 AST 活性。结果, 可获得图 23 所示的标定曲线。

(参考实施例 3)

(尿酸的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用的是 Iatro LQ UA (Yatron 有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司) 中使得尿酸浓度为 9.79mg/dl, 6.53 mg/dl 和 3.25 mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定尿酸浓度。结果, 可获得图 24 所示的标定曲线。

(参考实施例 4)

(葡萄糖的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用 Determiner GL.E 测定试剂 (Kyowa Medix 有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司) 中使得白蛋白浓度为 305mg/dl, 101.7mg/dl 和 50.9mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定葡萄糖浓度。结果, 可获得图 25 所

示的标定曲线。

(参考实施例 5)

(总胆固醇的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用用于总胆固醇测定的 HA Test Wako 纯胆固醇 E-HA Test Wako (Wako 纯化学有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司) 中使得总胆固醇浓度为 800mg/dl, 400mg/dl 和 200mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定葡萄糖浓度。结果, 可获得图 26 所示的标定曲线。

(参考实施例 6)

(HDL-胆固醇的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用 Chores Test HDL (Daiichi 纯化学有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司) 中使得 HDL - 胆固醇浓度为 76.8mg/dl, 48mg/dl 和 24mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定 HDL-胆固醇的浓度。结果, 可获得图 27 所示的标定曲线。

(参考实施例 7)

(LDL-胆固醇的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用 Chores Test LDL (Daiichi Kagaku Yakuhin 有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Chores Test LDL Calibrator (Daichi 纯化学有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水 (Kyoei 制药有限公司)

中使得 LDL-胆固醇浓度为 270mg/dl, 135mg/dl 和 62.5mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定 LDL-胆固醇的浓度。结果, 可获得图 28 所示的标定曲线。

(参考实施例 8)

(中性脂肪的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用用于自动分析仪-HR 甘油三酯-HR 测定的试剂(Wako 纯化学有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水(Kyoei 制药有限公司)中使得中性脂肪浓度为 208mg/dl, 104mg/dl 和 34.7mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定中性脂肪浓度。结果, 可获得图 29 所示的标定曲线。

(参考实施例 9)

(肌酐的测定)

关于测定试剂, 根据其说明书使用用于肌酐测定的 L 型肌酐 F(Wako 纯化学有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水(Kyoei 制药有限公司)中使得肌酐浓度为 1.58mg/dl, 0.79mg/dl 和 0.39mg/dl (计算值)。并且, 这些溶液和纯化水自身作为样本。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定中性脂肪浓度。结果, 可获得图 30 所示的标定曲线。

下面将描述有乳糜的血样的测定结果

(实施例 13)

关于测定试剂, 根据其说明书使用 HA Test Wako 胆固醇 E-HA Test Wako 的测定试剂(Wako 纯化学有限公司)。

关于样本, 使用其制备方法被部分改变的 Switrol A(Nissui 制药有限公司)。具体地说, 一瓶冻干产品溶于纯化水(Kyoei 制药有限公司)中使得总胆固醇浓度为 800mg/dl, 400mg/dl 和 200mg/dl 和 0mg/dl(纯化水自身)(计算值)。通过用乳糜和干扰校验/A Plus 的乳糜空白(Kokusai Siyak 有限公司)稀释这些溶液从而使其浓度减小因数 10 得到的溶液作为样本。另外, 用干扰校验/A Plus 的乳糜稀释的溶液是有乳糜的溶液, 用干扰校验/A Plus 的乳糜空白稀释的溶液是没有乳糜的溶液,

有乳糜的样本在稀释后的甲脂浓度为 2100 度。

关于光电转换检测装置, 使用的是具有与实施例 4 中类似结构的装置。并且, 以与实施例 8 相同的方式测定总胆固醇浓度。结果, 可获得图 31 所示的标定曲线。从图 31 所示的表中可以明显看出, 有乳糜的样本的标定曲线几乎与没有乳糜的样本的标定曲线相同。从这个结果可知道在光电转换检测方法中, 乳糜的影响较小。

然后, 使用分光光度计(Shimadzu UV2200)对以相同方式制备的待测样本进行 635 纳米波长处的吸光度测定。其结果显示在图 32 中。

从这个结果可知道, 有乳糜的样本的吸光度比没有乳糜的样本的吸光度大大约 0.2。从这些实事可知道, 在吸光度的测定中, 需要测定在两种不同波长处的吸光度用于减去背景。

工业应用性

如上所述, 根据本发明的测定物质的方法, 根据光电转换检测方法可以在短时间内, 简单且容易地在采自活有机体成分中的极少量样本中可定量测定诸如血红蛋白和 ALP 这些物质。另外, 根据本发明的用于测定物质的方法, 根据光热转换检测方法可以不引起在毛细管内的反应产物形成沉淀或结晶, 于是可进行稳定的测定。由于该方法使用具有长波长的输出的激光作为激发光, 因此可以低成本地生产光热转换检测装置, 结果, 可以低成本进行测定。

另外, 根据本发明的用于测定物质的方法, 样本制备步骤和光热转换检测步骤在微片内进行。因此测定中仅需要从活有机体成分中采集极少量的样本以及极少量测定试剂即可。另外通过将采自活有机体成分中的样本和测定试剂混合以制备待测样本的操作简单且容易, 另外, 产生的废液的量也很小。

特别是根据本发明的用于测定血红蛋白的方法, 可以以稳定的方式进行血红蛋白的测定。另外, 可以没有特别的操作测定试剂的危险以及处理废液的麻烦, 因为它不含有氰化物、一种有毒物质。

另外, 根据本发明用于测定物质的方法, 即使血样中有乳糜, 这在临床实验室检验中是个问题, 而在本发明中不需要在两个不同波长进行检验, 仅一次即可进行定量。

另外, 本发明的测定试剂的用途使得可以在从活有机体成分中采集的极少量样本中根据光热转换检测方法稳定地进行物质, 如血红蛋白和 ALP 的定量。

图 1

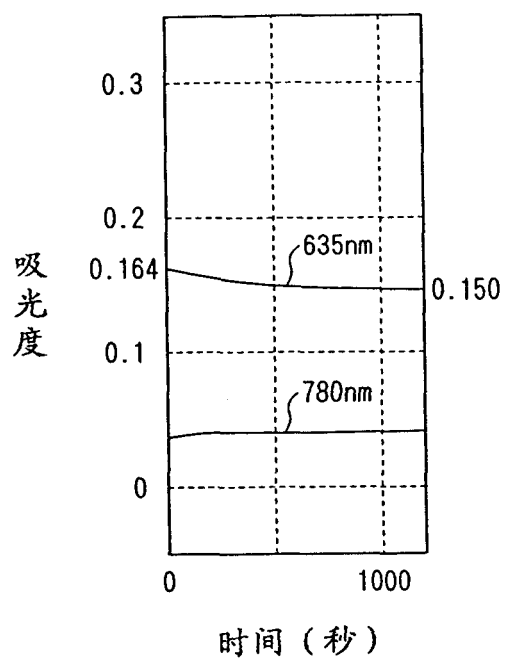


图 2

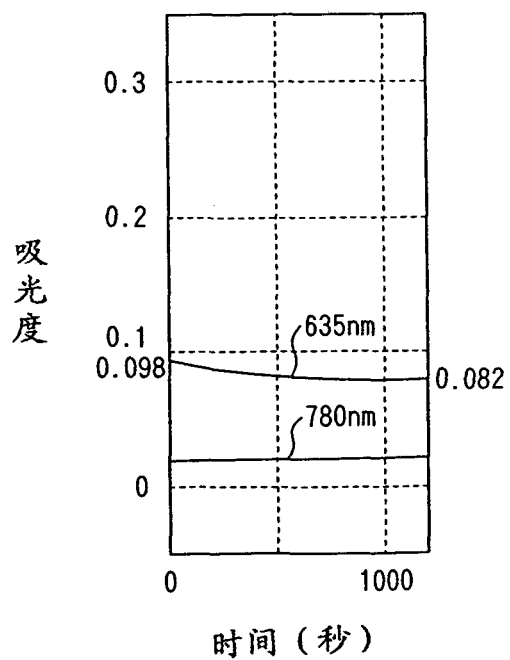


图 3

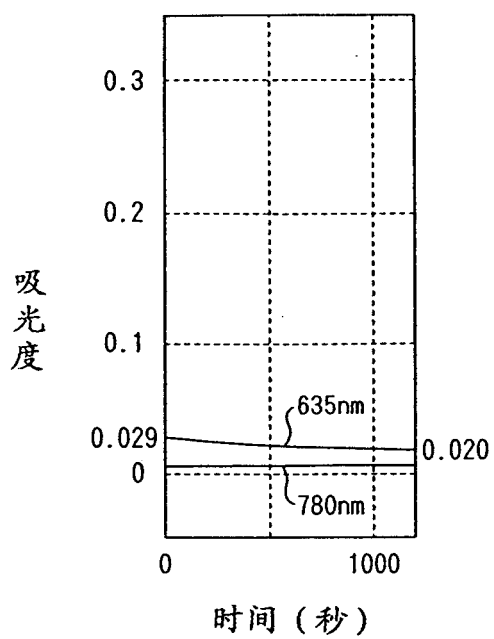


图 4

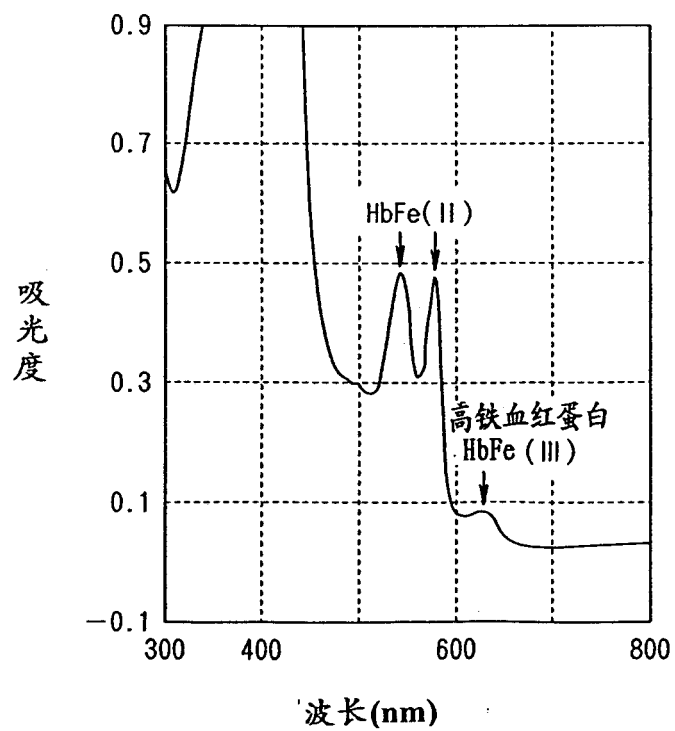


图 5

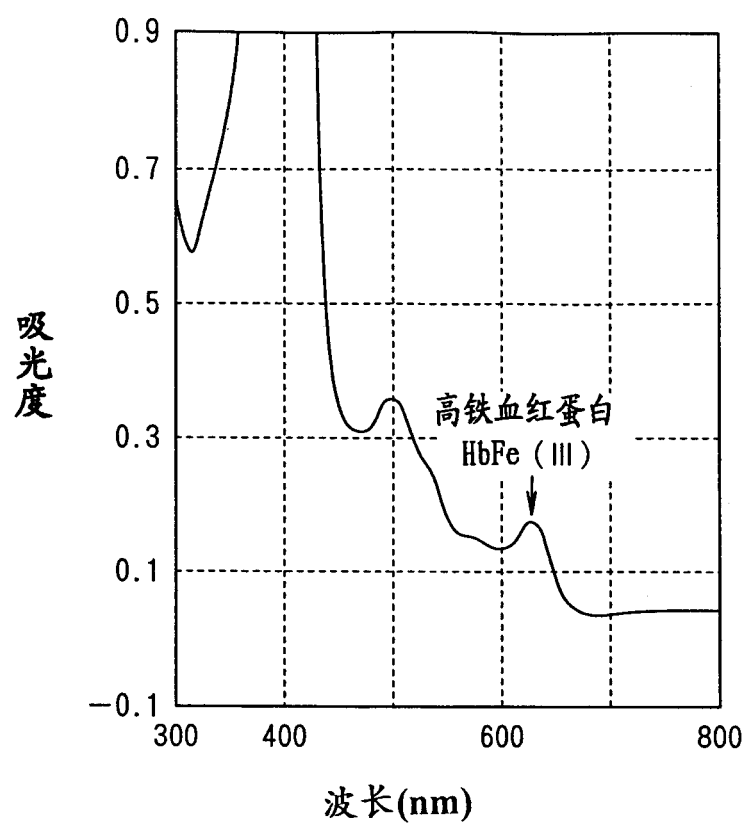


图 6 (a)

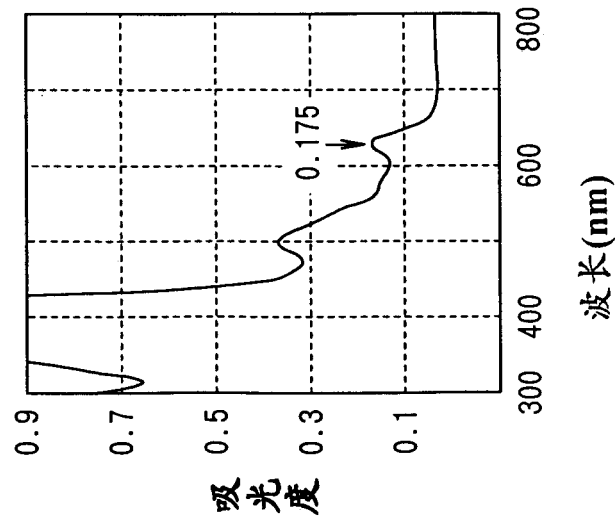


图 6 (b)

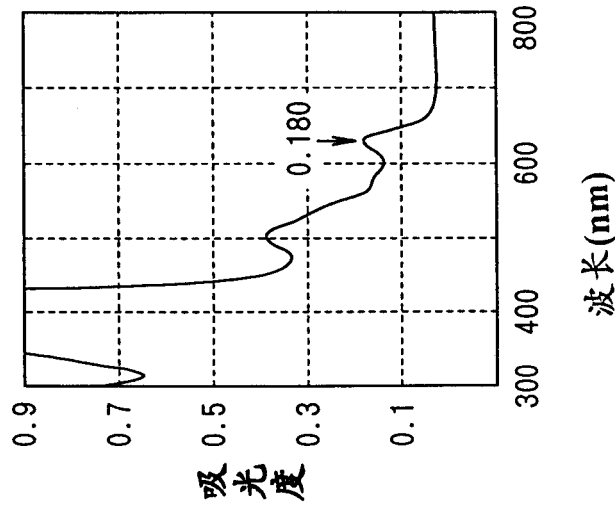


图 6 (c)

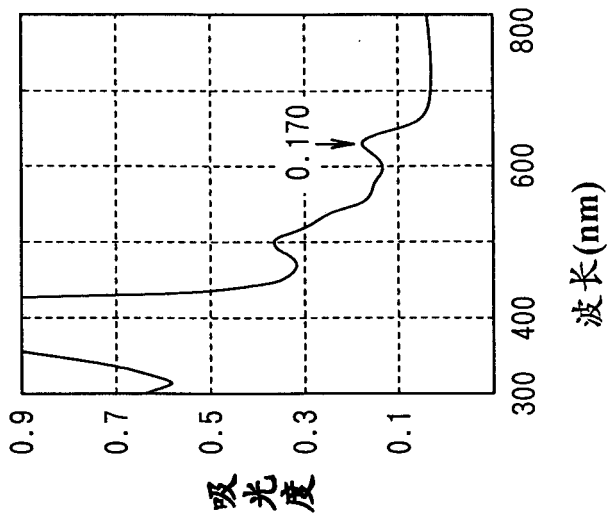


图 7

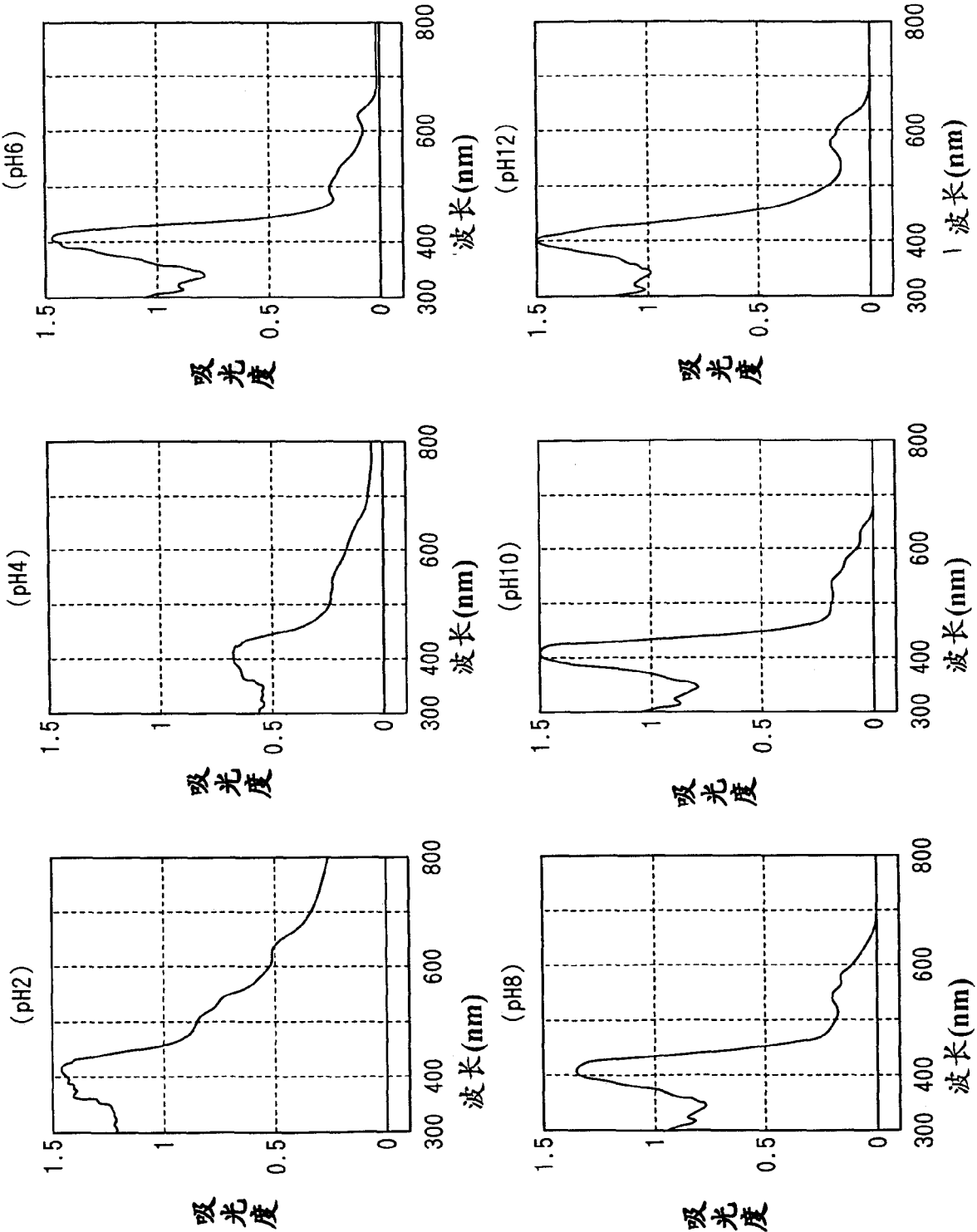


图 8 (a)

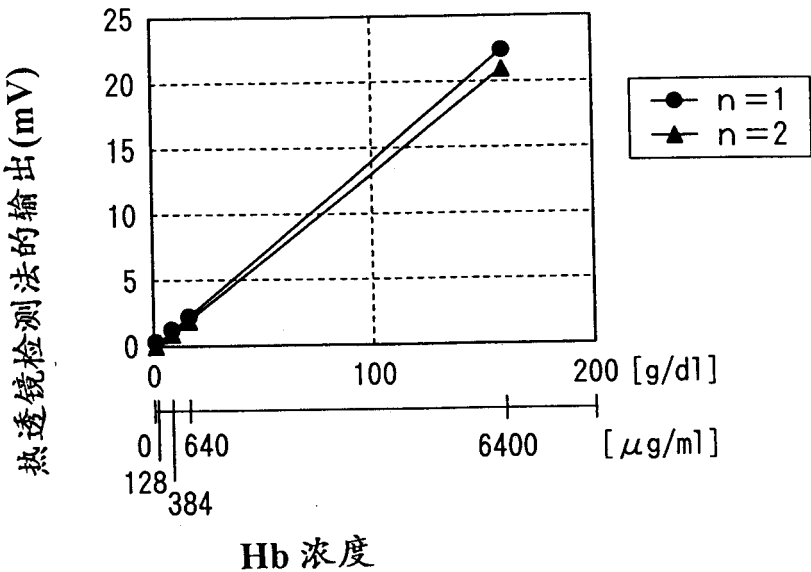


图 8 (b)

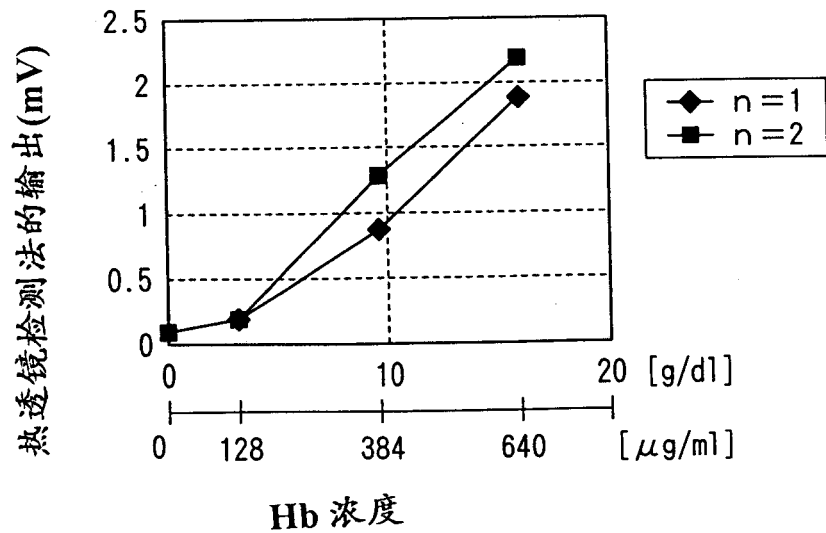


图 9

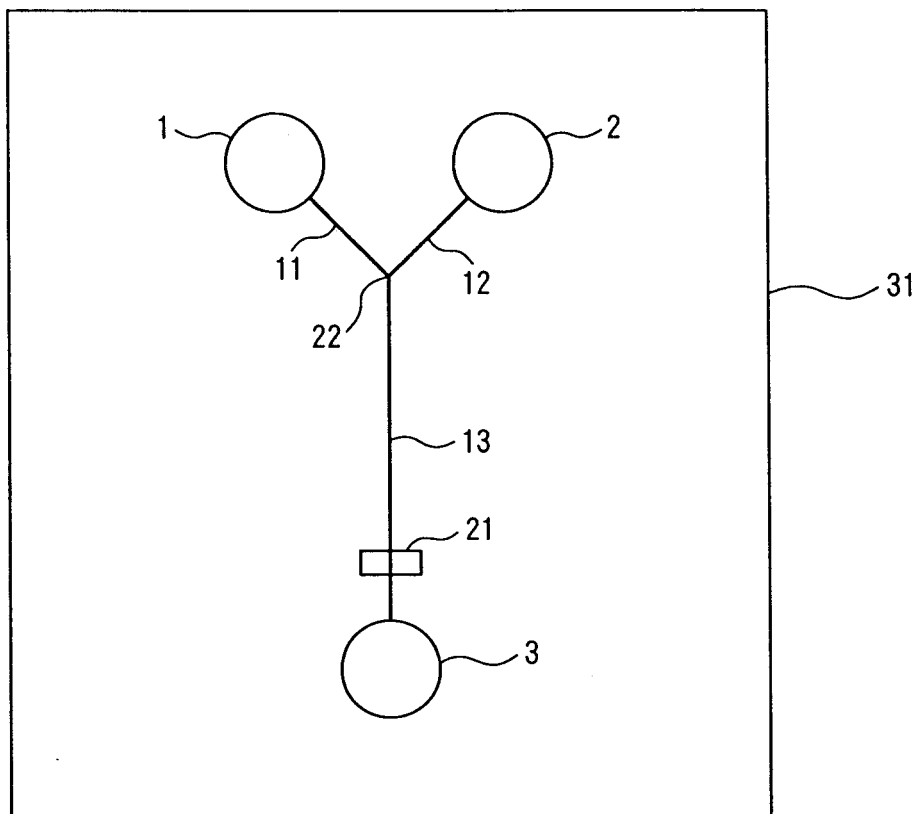


图 1 0

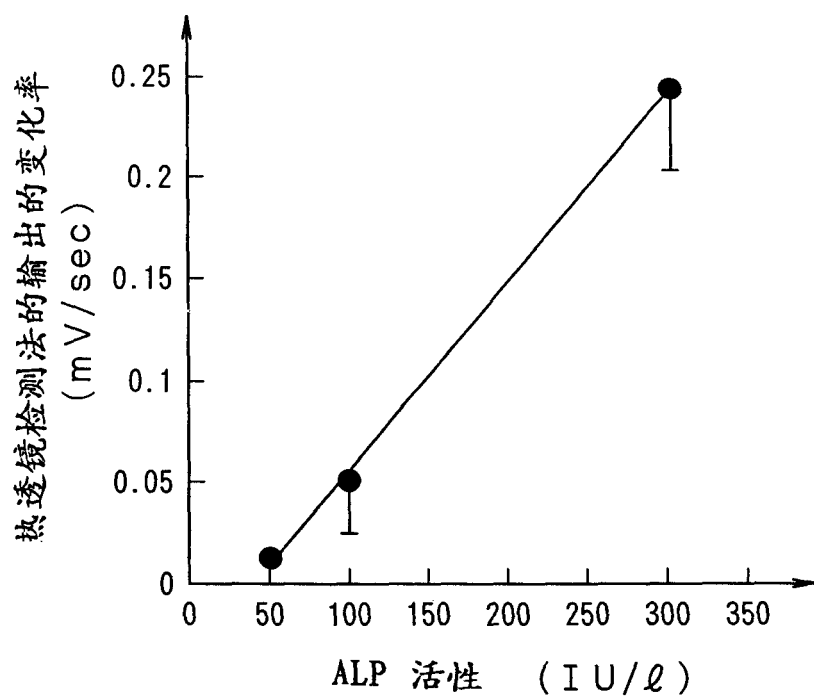


图 1 1

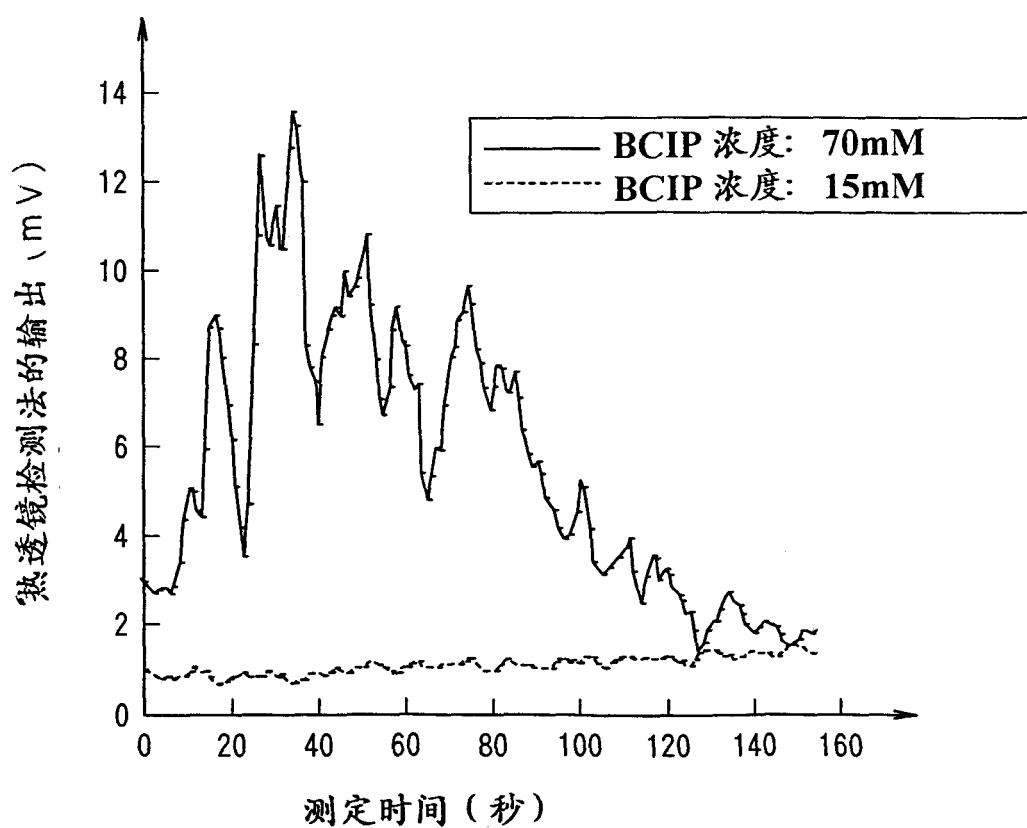


图 1 2

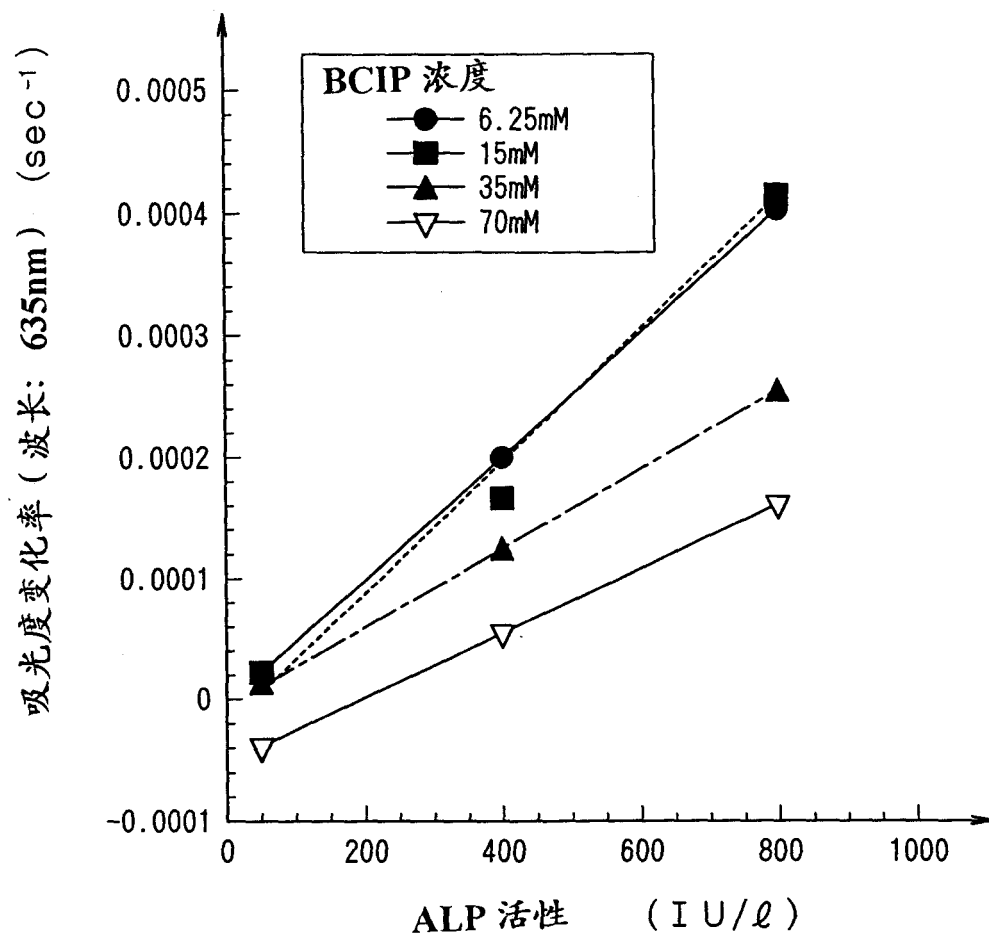


图 13

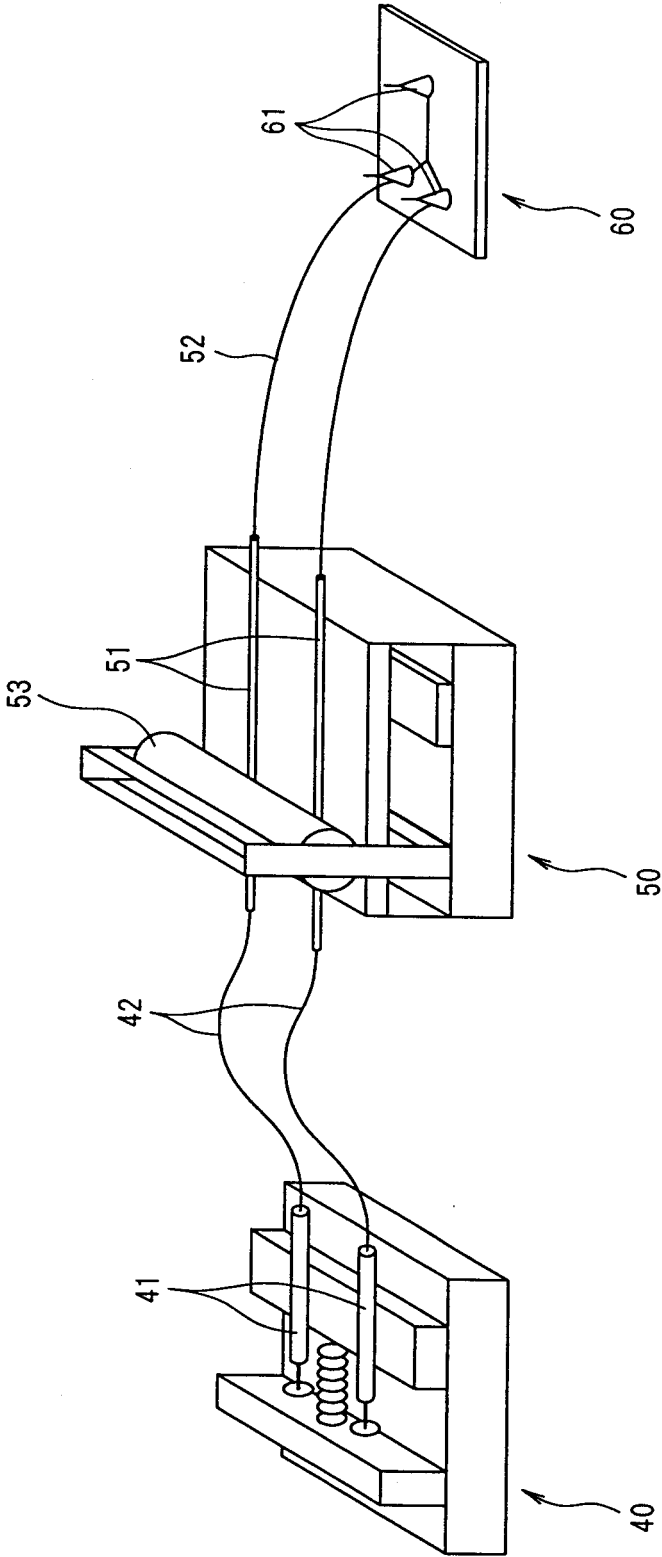


图 1 4

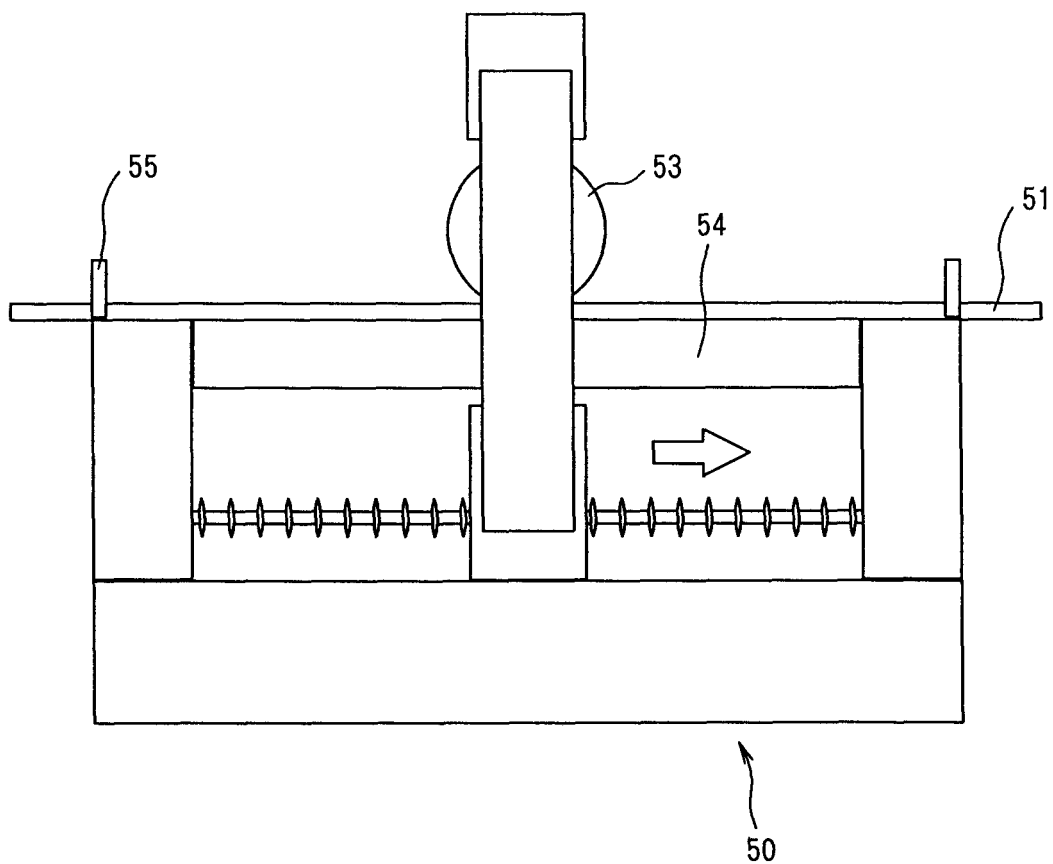


图 1 5

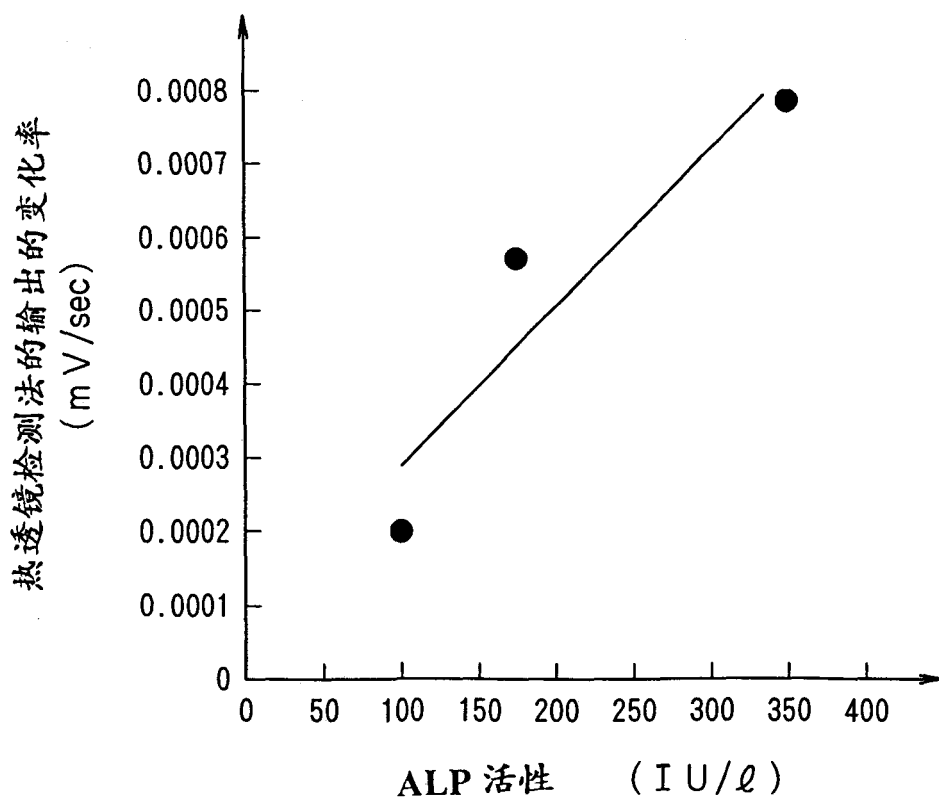


图 16

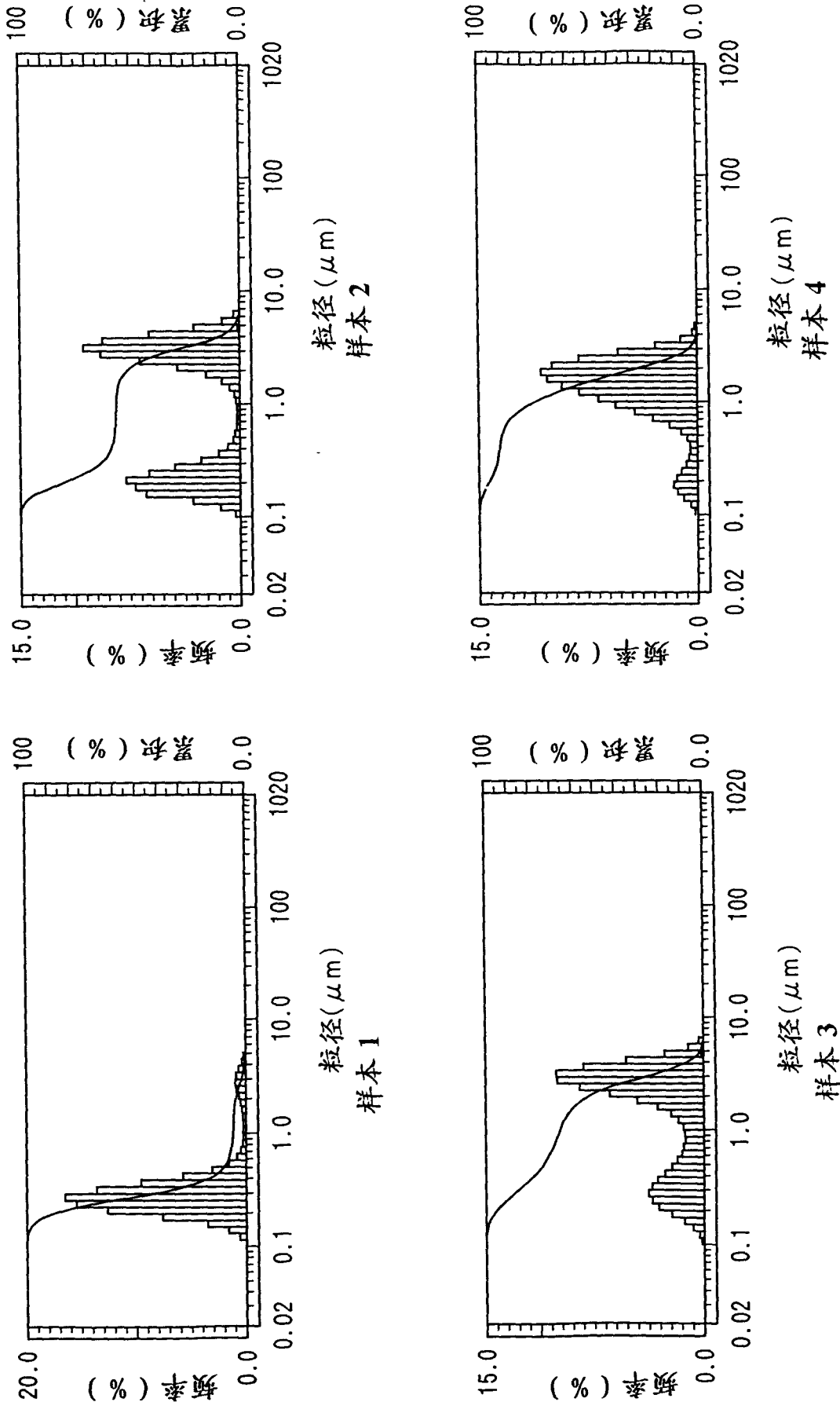


图 1 7

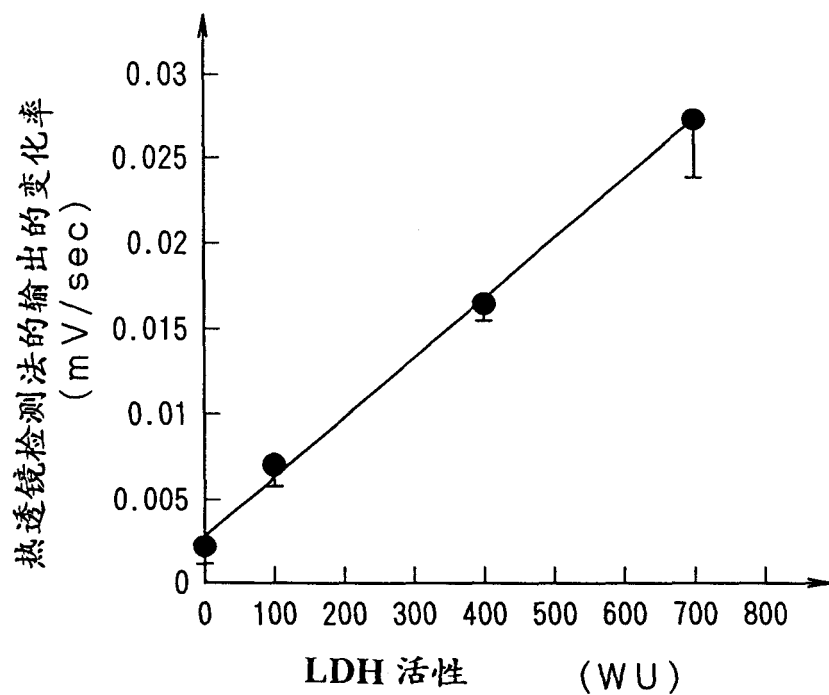


图 1 8

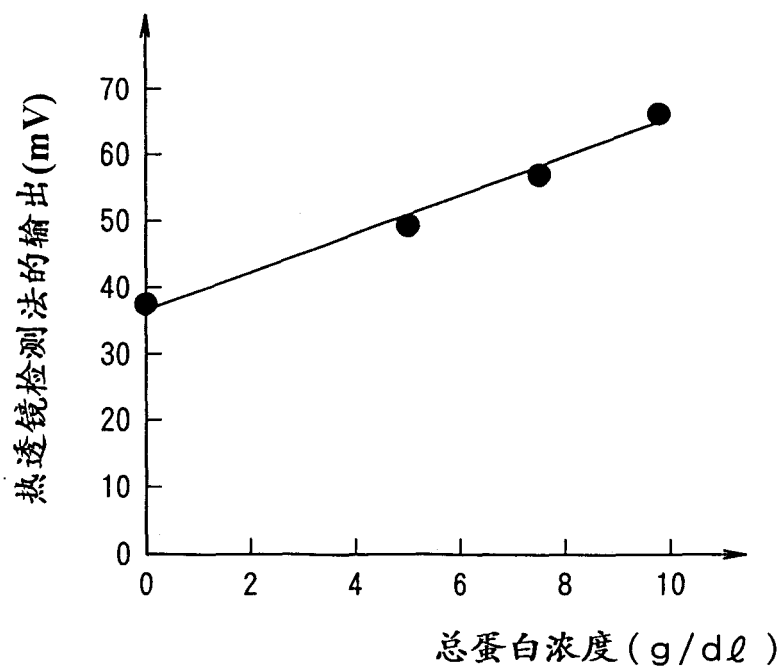


图 19

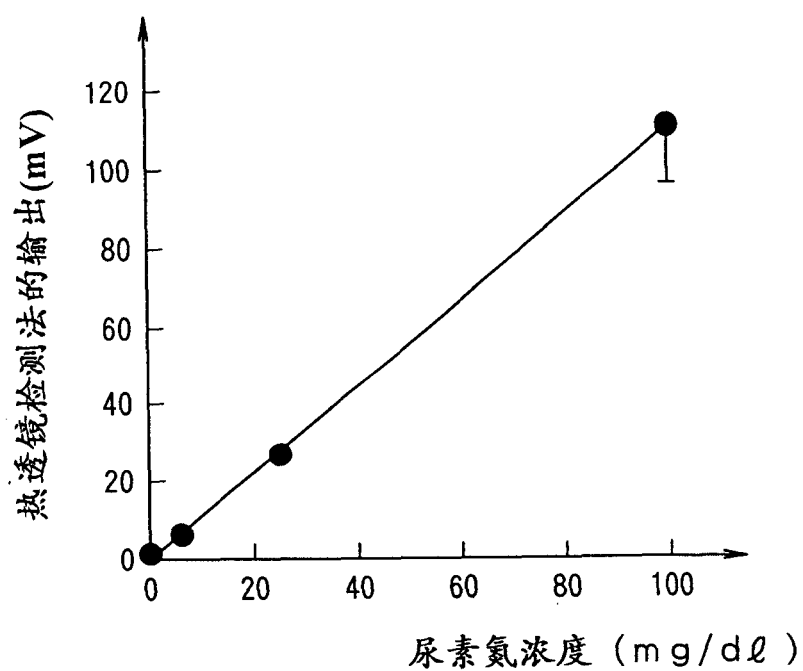


图 20

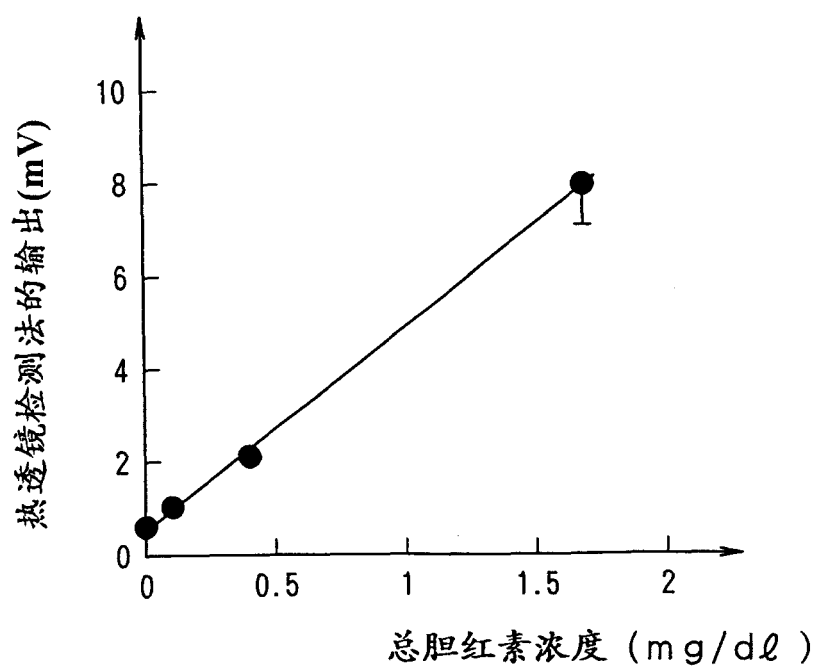


图 2 1

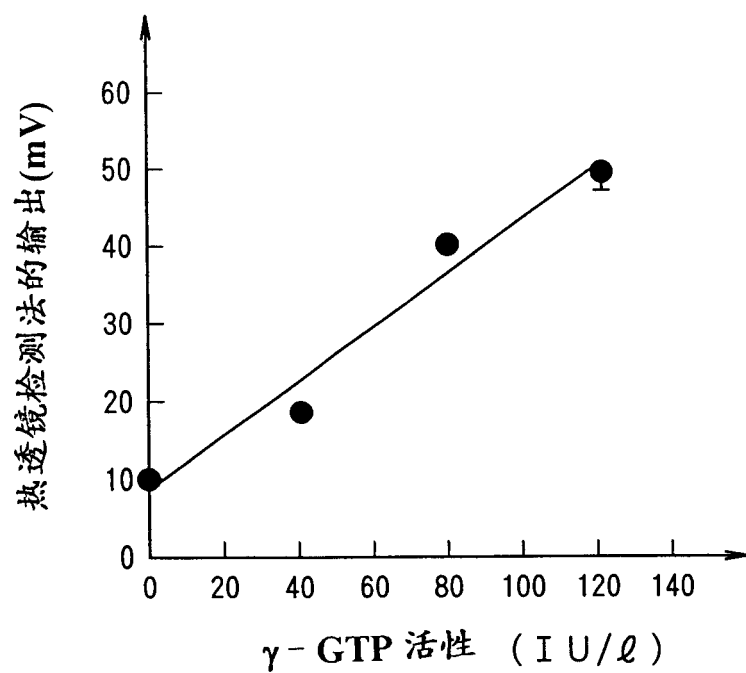


图 2 2

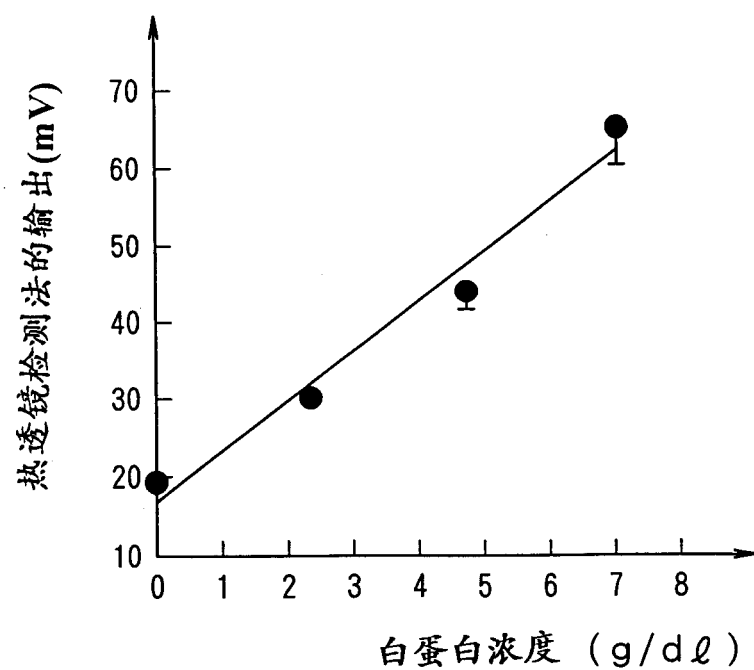


图 2 3

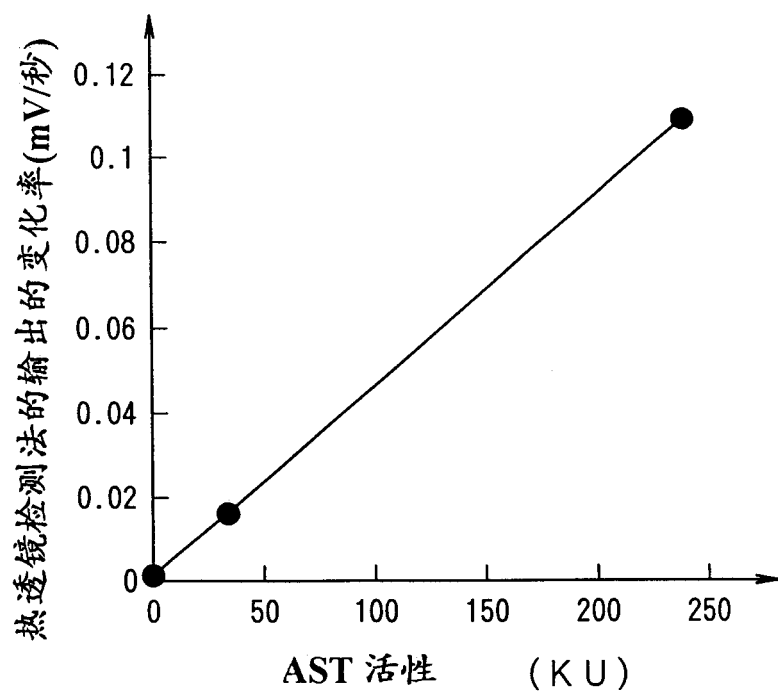


图 2 4

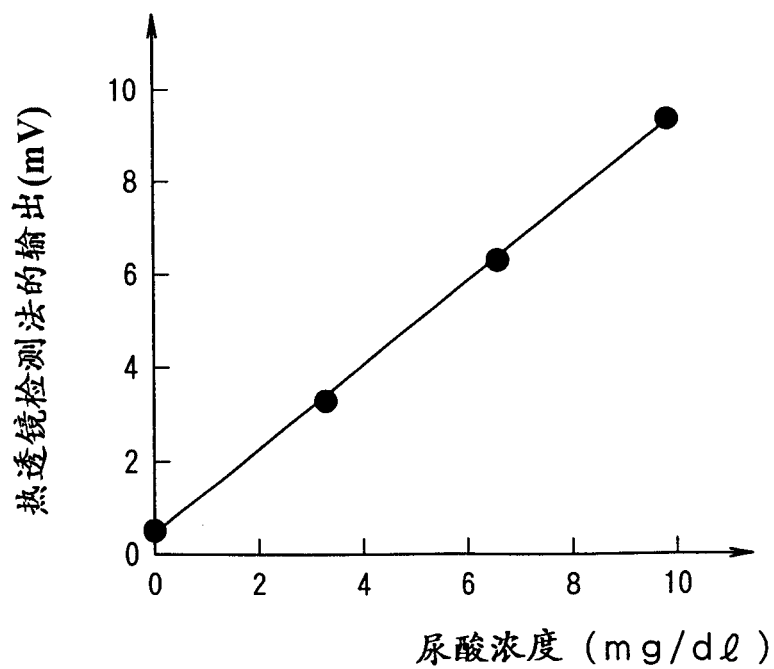


图 2 5

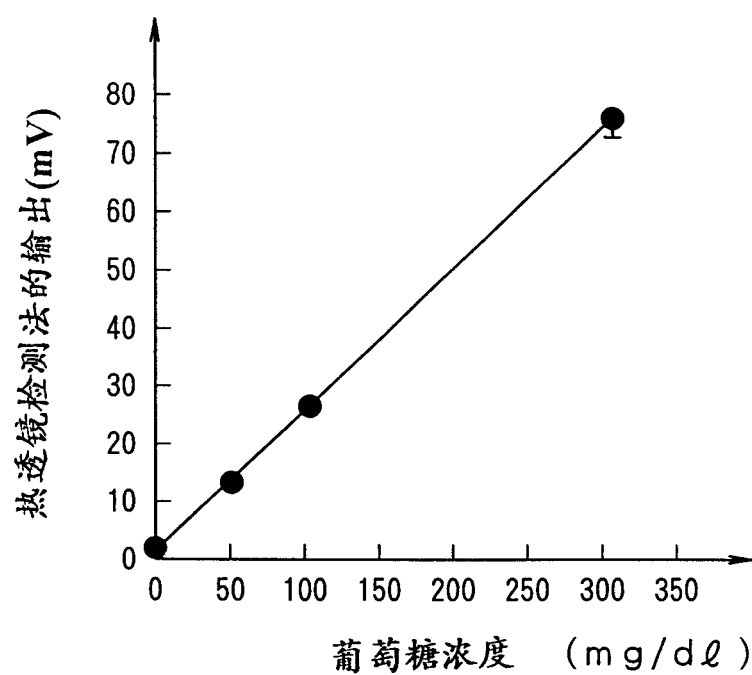


图 2 6

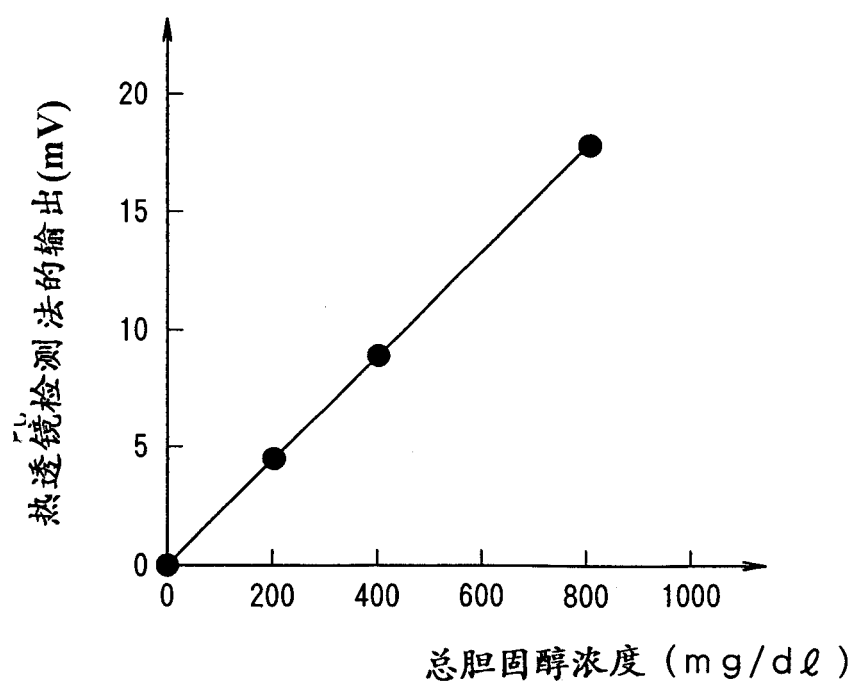


图 2 7

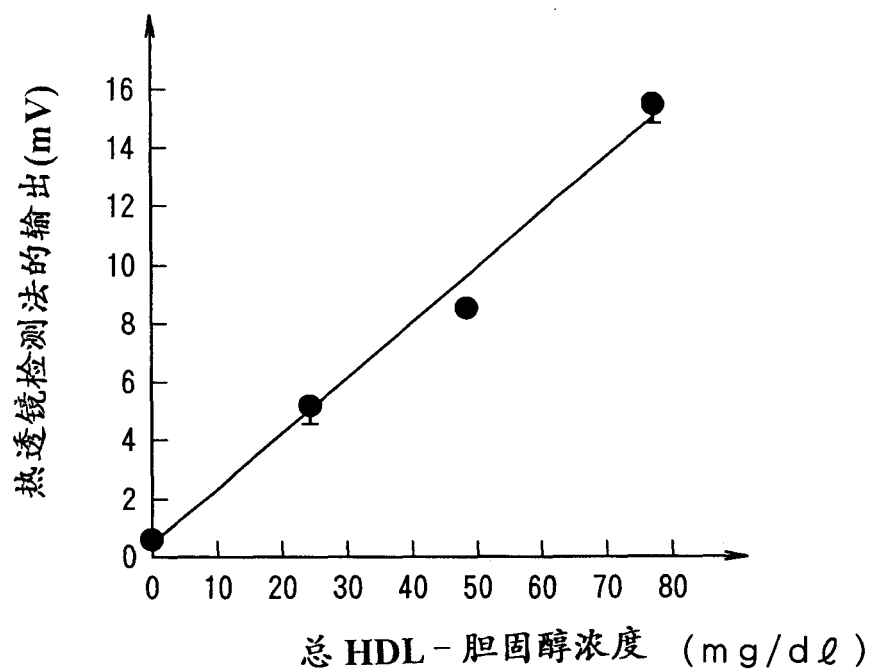


图 2 8

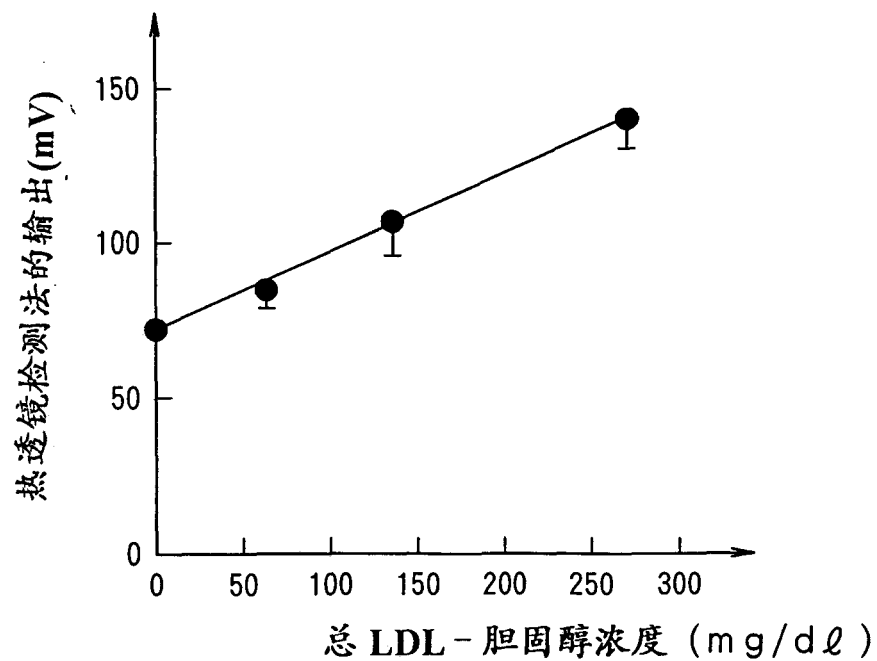


图 29

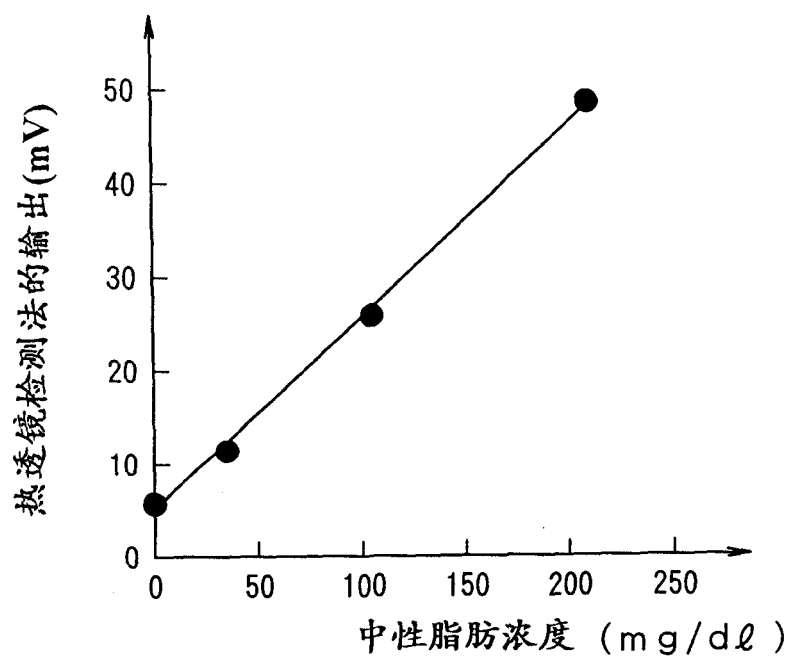


图 30

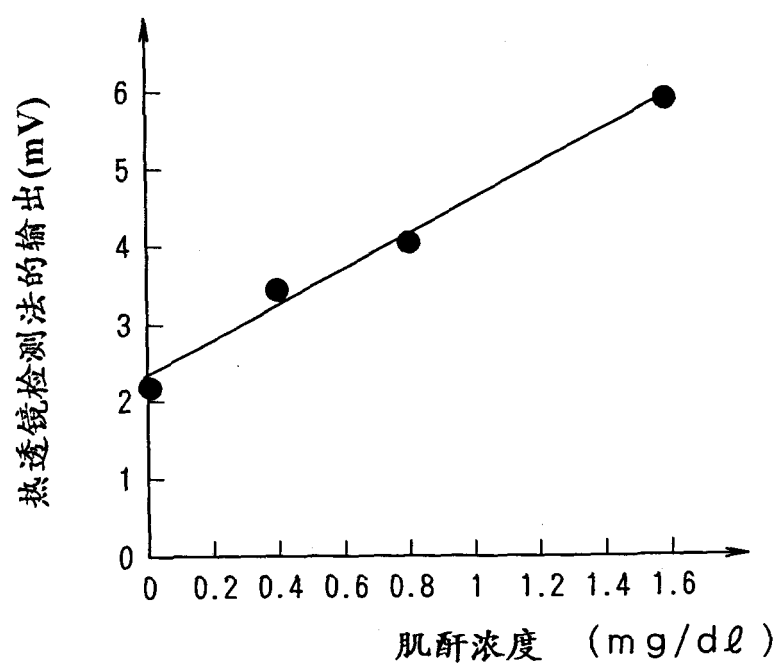


图 3 1

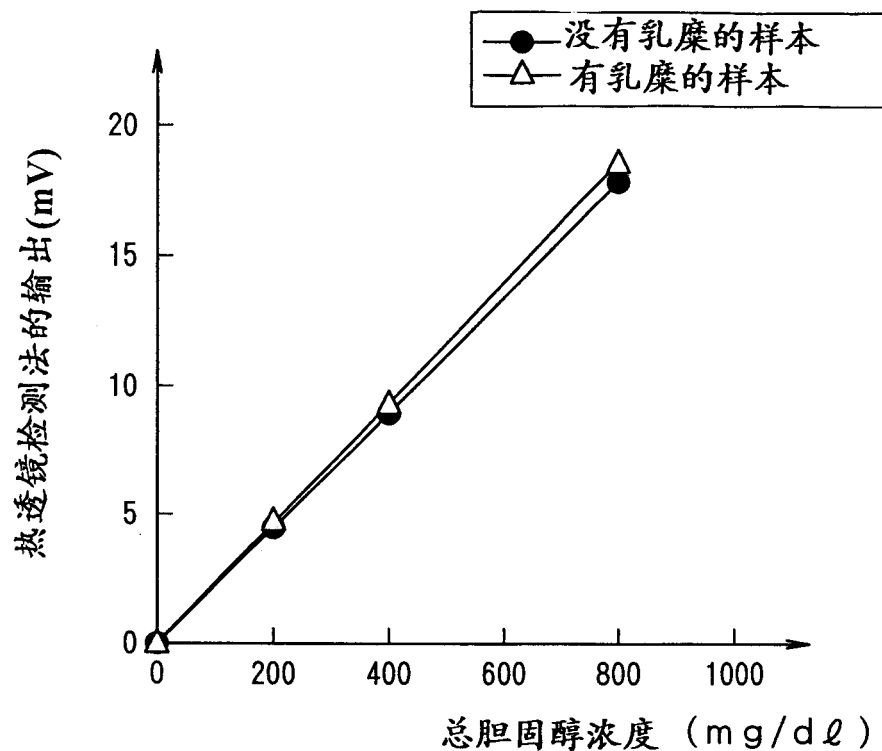
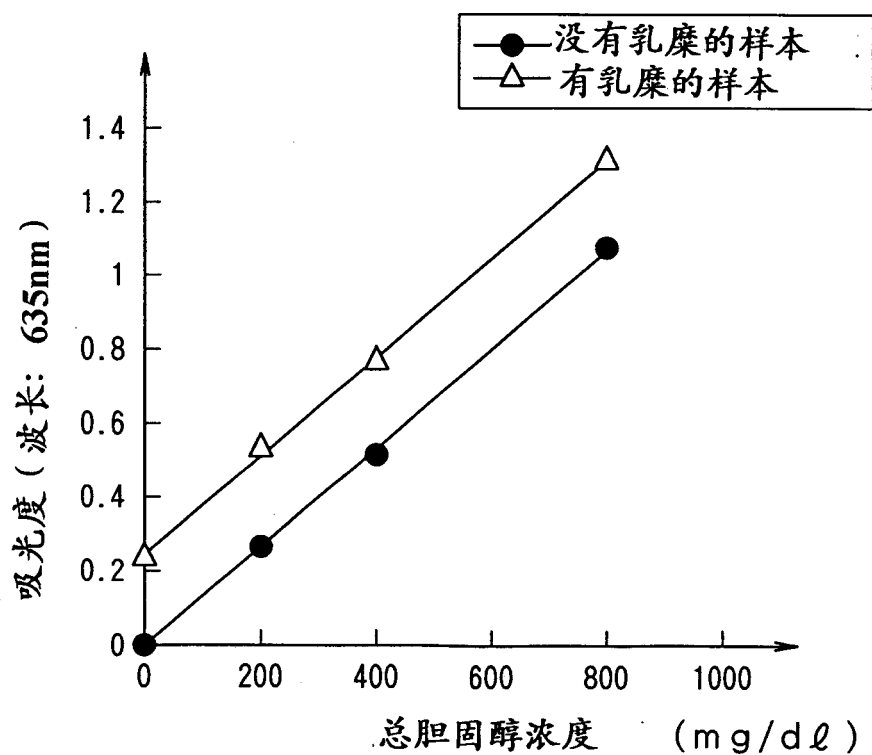


图 3 2



专利名称(译)	测定物质的方法和用于该方法中的测定试剂		
公开(公告)号	CN1129790C	公开(公告)日	2003-12-03
申请号	CN00811667.9	申请日	2000-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	旭化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	旭化成株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	旭化成株式会社		
[标]发明人	北口畅哉 金川章孝 片仓直子		
发明人	北口畅哉 金川章孝 片仓直子		
IPC分类号	G01N21/17 G01N21/78 G01N33/537 G01N33/543 G01N33/72 G01N25/16		
CPC分类号	G01N33/54373 G01N21/78 G01N21/171 G01N33/5375 G01N33/721		
代理人(译)	李华英		
优先权	1999203406 1999-07-16 JP		
其他公开文献	CN1370276A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于测定物质的方法，其特征在于在微片的毛细管中进行样本制备和用光热转换检测方法进行检测。根据该方法，可以在短时间内很方便地从生物成份来源的极少量样本中定量存在于生物成份来源的样本中的血红蛋白、ALP等。另外，测定仅形成很少量的废液。由于使用长波长激光做为激发光，因此可以很经济地生产光热转换检测装置，所以测定可以以低成本进行。由于这些特征，上述方法适用于POC分析等。另外，通过使用该方法，即使血样显示有乳糜存在但仍可用光热转换检测方法很方便地检测。一种测定试剂，使得可以用光热转换检测方法很稳定地定量源自生物成分的微量样本中的血红蛋白、ALP等。

