



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106574934 B

(45)授权公告日 2019.01.04

(21)申请号 201580037164.4

(22)申请日 2015.06.17

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106574934 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(30)优先权数据
2014-139281 2014.07.07 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.01.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2015/067386 2015.06.17

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/006398 JA 2016.01.14

(73)专利权人 株式会社日立高新技术
地址 日本东京

(72)发明人 野上真 伊藤伸也 薮原忠雄

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 胡秋瑾

(51)Int.Cl.

G01N 35/10(2006.01)

G01N 15/12(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

JP 特开平7-318559 A,1995.12.08,
CN 101275962 A,2008.10.01,

审查员 王奇云

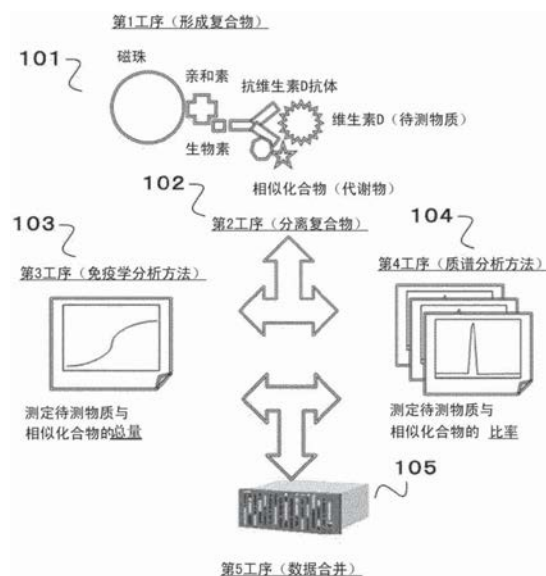
权利要求书2页 说明书11页 附图6页

(54)发明名称

分析装置以及分析方法

(57)摘要

在具备免疫学分析方法和质谱分析方法的情况下,由于流入免疫学分析方法用流路的复合物以及流入质谱仪用流路的复合物的量未知,因此,即便对通过免疫学分析方法所获得的信息和通过质谱分析方法所获得的信息进行合并,仍然无法准确地定量待测物质,其中,所述免疫学分析方法中利用抗原-抗体反应形成微粒与待测物质的复合物并纯化,然后利用光谱法进行测定,所述质谱分析方法中利用抗原-抗体反应形成微粒与待测物质的复合物并纯化,然后用质谱仪进行测定。本发明具有在形成复合物后、在质谱分析方法用流路和免疫学分析方法用流路上定量复合物的机构。



1. 一种分析装置,其特征在于,具备:

样本传送部,该样本传送部传送样本容器;

试剂传送部,该试剂传送部传送试剂容器;

反应溶液传送部,该反应溶液传送部传送进行反应的反应容器;

样本取样器,该样本取样器将样本从样本容器抽吸、排出到反应容器;

试剂取样器,该试剂取样器将试剂从试剂容器抽吸、排出到反应容器;

反应溶液取样器,该反应溶液取样器将在反应容器内反应后的复合物抽吸、排出到分离部;

分离部,该分离部将复合物定量分离为免疫学分析方法用复合物和质谱分析方法用复合物;

质谱分析部,该质谱分析部利用质谱仪对分离为质谱分析方法用的复合物进行测定;

免疫学分析部,该免疫学分析部利用光学方法对分离为免疫学分析方法用的复合物进行测定;以及

控制部,该控制部进行数据处理。

2. 如权利要求1所述的分析装置,其特征在于,

所述分离部由以下部分构成:注入器,该注入器将从反应容器取样器排出的复合物导入分离部;流路,该流路具有分叉部;泵,该泵将溶剂输送到流路;主动分流器,该主动分流器位于流路的分叉部;粒子分布测定装置,该粒子分布测定装置能够实时测定注入器和主动分流器之间的流路上的复合物量;质谱分析方法用流路,该质谱分析方法用流路位于主动分流器的下游,将复合物输送到质谱分析部;以及免疫学分析方法用流路,该免疫学分析方法用流路位于主动分流器的下游,将复合物输送到免疫学分析部。

3. 如权利要求1所述的分析装置,其特征在于,

所述分离部由以下部分构成:注入器,该注入器将从反应容器取样器排出的复合物导入分离部;流路;泵,该泵将溶剂输送到流路;粒子分布测定装置,该粒子分布测定装置设置于注入器的下游及流路的下游所设置的分叉为2股的部位的上游;质谱分析方法用流路,该质谱分析方法用流路是流路的下游所设置的分叉为2股中的一侧流路,用于将复合物输送到质谱分析部;免疫学分析方法用流路,该免疫学分析方法用流路为另一侧流路,用于将复合物输送到免疫学分析部;配置于质谱分析方法用流路的管外侧的磁体;以及配置于免疫学分析方法用流路的管外侧的磁体。

4. 如权利要求1所述的分析装置,其特征在于,

所述分离部由以下部分构成:注入器,该注入器将从反应容器取样器排出的复合物导入分离部;流路;泵,该泵将溶剂输送到流路;主动分流器,该主动分流器位于流路的分叉处;质谱分析方法用流路,该质谱分析方法用流路位于主动分流器的下游,用于将复合物输送到质谱分析部;免疫学分析方法用流路,该免疫学分析方法用流路位于主动分流器的下游,用于将复合物输送到免疫学分析部;库尔特计数器,该库尔特计数器设置于质谱分析方法用流路上;以及粒子分布测定装置,该粒子分布测定装置设置于免疫学分析方法用流路上。

5. 如权利要求1所述的分析装置,其特征在于,

所述分离部由以下部分构成:分离容器,该分离容器接收从反应容器取样器排出的复

合物;分离容器传送部,该分离容器传送部传送分离容器;以及分离取样器,该分离取样器从分离容器抽吸固定量复合物,并导入质谱分析部及免疫学分析部。

6.如权利要求1至5中任一项所述的分析装置,其特征在于,

控制部根据质谱分析部计算出的数据以及免疫学分析部计算出的数据,定量待测物质。

7.如权利要求6所述的分析装置,其特征在于,

质谱分析部计算出的数据是构成复合物的待测物质及相似化合物的比率,免疫学分析部计算出的数据是构成复合物的待测物质及相似化合物的总量。

8.一种分析方法,其特征在于,具备以下工序:第1工序,该第1工序形成微粒与待测物质的复合物;第2工序,该第2工序对复合物分离已知量;第3工序,该第3工序通过免疫学分析方法测定分离后的复合物;第4工序,该第4工序通过质谱分析方法测定分离后的复合物;以及第5工序,该第5工序根据第3工序中获取的数据和第4工序中获取的数据,定量待测物质;

在所述第2工序中,基于复合物量一边切换流路一边进行分离。

9.如权利要求8所述的分析方法,其特征在于,

在第3工序中获取的数据是构成复合物的待测物质及相似化合物的总量,在第4工序中获取的数据是构成复合物的待测物质及相似化合物的比率,在第5工序中根据构成复合物的待测物质及相似化合物的总量及比率的数据,计算待测物质的定量值。

10.如权利要求8所述的分析方法,其特征在于,

微粒由磁珠和多种抗体构成,同时测定多个待测物质。

11.如权利要求8所述的分析方法,其特征在于,

待测物质是25-羟基维生素D₂及25-羟基维生素D₃,相似化合物是维生素D₂、1 α ,25-二羟基维生素D₂、24R,25-二羟基维生素D₂、维生素D₃、1 α ,25-二羟基维生素D₃、24R,25-二羟基维生素D₃中的任一种物质。

分析装置以及分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分析装置以及分析方法。

背景技术

[0002] 本技术领域的背景技术有US2008/0217254 (专利文献1)。该发明中记载“一种自动化装置及方法,其具备配置于毛细管流路上的旋转式微粒(磁珠)捕获部和高效液相色谱串联质谱仪,在微粒捕获部中对预先结合有抗体的微粒与待测物质结合而成的复合物进行补充,清洗,从微粒中洗脱待测物质”。同样,本技术领域的背景技术还有日本专利特开平1-187459。该发明中记载“一种免疫学分析方法,其在反应的固相上发生抗原-抗体反应,预先结合有抗体的微粒与待测物质通过抗原-抗体反应结合为复合物,使该复合物从反应的固相游离出来,并利用光谱法进行测定,定量目标成分”。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:US2008/0217254

[0006] 专利文献2:日本专利特开平1-187459

发明内容

[0007] 发明所要解决的技术问题

[0008] 在所述专利文献1中记载了如下技术:对预先结合有抗体的微粒与待测物质结合而成的复合物进行补充,开展清洗及从微粒中洗脱待测物质的处理后,利用高效液相色谱串联质谱仪进行测定的技术(以下,将本技术记载为质谱分析方法)。在所述专利文献2中记载了如下技术:在反应的固相上发生抗原-抗体反应,预先结合有抗体的微粒与待测物质通过抗原-抗体反应结合为复合物,使该复合物从反应的固相游离出来,并利用光谱法进行测定的技术(以下,将本技术记载为免疫学分析方法)。

[0009] 关于这两个技术的纯化处理,利用抗原-抗体反应形成微粒与待测物质的复合物的工序是通用的。另一方面,关于通过测定而获得的信息,在免疫学分析方法中是利用光谱法对微粒与待测物质结合而成的复合物进行测定,因此,能够获得复合物与结合的待测物质的总量信息。免疫学分析方法的测定技术简便、灵敏度高,适用于微量成分的定量测定,但存在交叉反应性的问题。交叉反应性是指抗体不仅捕获原本应识别的待测物质,还会捕获例如待测物质的代谢物等具有相似结构的分子(相似化合物)的现象。这意味着定量结果会高于真实值,无法准确地定量待测物质。质谱分析方法使待测物质从微粒与待测物质结合而成的复合物中洗脱,然后利用质谱仪进行测定,因此,能够获取待测物质的质量数信息及相关质量数的分子峰强度。质谱分析方法能够高精度地分离具有相似结构的分子,因此,即便预先结合有抗体的微粒与待测物质发生交叉反应,仍然能够检测出待测物质。然而,质谱分析方法需要使待测物质离子化。要将生物样本中的待测物质离子化时,生物样本中的杂质又会阻碍离子化(离子抑制)。该离子抑制会极大地影响定量精度,因此,需要准备离子

化效率与待测物质相等、并且预先已知浓度的内标物质。多数情况下,内标物质使用待测物质的稳定同位素标记物质,但稳定同位素标记物质的价格极其昂贵。

[0010] 类似本发明的组合免疫学分析方法与质谱分析方法的分析装置目前尚无报告。如果只是简单地组合免疫学分析方法和质谱分析方法,在形成复合物后,在质谱分析方法用流路和免疫学分析方法用流路上并不具备定量(分离已知量)复合物的机构。因此,对通过质谱分析方法所获得的信息和通过免疫学分析方法所获得的信息进行合并时,无法计算出待测物质的准确定量值。

[0011] 解决技术问题所采用的技术方案

[0012] 为解决上述问题,本发明的分析装置具备:样本传送部,该样本传送部传送样本容器;

[0013] 试剂传送部,该试剂传送部传送试剂容器;

[0014] 反应溶液传送部,该反应溶液传送部传送进行反应的反应容器;

[0015] 样本取样器,该样本取样器将样本从样本容器抽吸、排出到反应容器;

[0016] 试剂取样器,该试剂取样器将试剂从试剂容器抽吸、排出到反应容器;

[0017] 反应溶液取样器,该反应溶液取样器将在反应容器内反应后的复合物抽吸、排出到分离部;

[0018] 分离部,该分离部将复合物定量分离为免疫学分析方法用复合物和质谱分析方法用复合物;

[0019] 质谱分析部,该质谱分析部利用质谱仪对分离为质谱分析方法用的复合物进行测定;

[0020] 免疫学分析部,该免疫学分析部利用光学方法对分离为免疫学分析方法用的复合物进行测定;以及

[0021] 控制部,该控制部进行数据处理。

[0022] 发明效果

[0023] 本发明提供一种分析装置,该分析装置能消除免疫学测定方法的交叉反应性,在质谱分析方法中无需使用昂贵的内标物质。

附图说明

[0024] 图1是表示本发明工序概要的概要构成图。

[0025] 图2是表示本发明分析装置的一个实施方式所涉及的概要构成的简图。

[0026] 图3是说明本发明分析装置的一个实施方式所涉及的第1工序的图。

[0027] 图4是说明本发明分析装置的一个实施方式所涉及的第2工序的图。

[0028] 图5是说明本发明分析装置的一个实施方式所涉及的第3工序的图。

[0029] 图6是说明本发明分析装置的一个实施方式所涉及的第4工序的图。

[0030] 图7是说明本发明分析装置的一个实施方式所涉及的第5工序的图。

[0031] 图8是说明本发明实施例2所记载的分析装置的一个实施方式所涉及的第2工序的图。

[0032] 图9是说明本发明实施例3所记载的分析装置的一个实施方式所涉及的第2工序的图。

[0033] 图10是表示本发明实施例4所记载的分析装置的一个实施方式所涉及的概要构成的简图。

具体实施方式

[0034] 以下,根据附图详细说明本发明实施方式。另外,在用于说明本实施方式的所有图中,原则上对具有相同机构的部分标记相同标号,尽可能地省略重复说明。

[0035] 实施例1

[0036] 作为本发明的一个典型实施例,利用图1~7,针对以维生素D代谢物为待测物质的情况进行说明。

[0037] (维生素D的说明)

[0038] 维生素D是被发现为抗佝偻病因子的脂溶性维生素,对维持人体血液中钙浓度的稳定性发挥着重要的作用。人体会生成维生素D₃。维生素D₂则可以通过植物或生物合成而生成,并作为食物或补充剂被摄入到体内。以下对维生素D₃代谢物进行说明。在皮肤中由7-脱氢胆固醇生物合成的维生素D₃在肝脏中被代谢为25-羟基维生素D₃(25-OH D₃),与维生素D结合蛋白(DBP)相结合,在体内循环。若血钙浓度在正常值以下,则25-OH D₃在肾脏中会被代谢为1 α ,25-二羟基维生素D₃[1 α ,25-(OH)₂D₃]。若血钙浓度恢复正常,则对1 α 位的羟基化受到抑制,25-OH D₃主要被代谢为24R,25-二羟基维生素D[24,25-(OH)₂D₃]。维生素D₂也按照和维生素D₃相同的途径进行代谢。也就是说,血液中主要的维生素D代谢物有维生素D₃、25-OH D₃、1 α ,25-(OH)₂D₃、24,25-(OH)₂D₃、维生素D₂、25-OH D₂、1 α ,25-(OH)₂D₂以及24,25-(OH)₂D₂至少8种。在临床现场,将血液中高浓度、稳定存在的25-OH D₃以及25-OH D₂的总量用作反映血液中维生素D浓度的指标。

[0039] (现有的免疫学分析方法的说明)

[0040] 在应用现有的免疫学分析方法的维生素D测定方法中,测定在血液中循环的25-OH D₃以及25-OH D₂的总量,将其用作反映血液中维生素D浓度的指标。免疫学分析方法的处理工序如下所示。生物样本中的待测物质25-OH D₃以及25-OH D₂与DBP结合,因此,添加酸、碱或者还原剂使之游离出来。继而,预先通过生物素-亲和素结合等方式使特异性识别待测物质的抗体与磁珠结合,使处理后的生物样本进行反应。利用磁体对结合有抗体的磁珠与待测物质结合而成的复合物进行集磁,清洗后利用酶标记的抗免疫球蛋白抗体开展夹心法。接着,添加酶的底物(发光或显色试剂),用检测器检测酶反应的生成物。但是,因免疫学分析方法中所使用的抗体种类不同,除待测物质外,还可能会捕获到相似化合物,导致定量结果高于真实值。这里所谓的“生物样本”定义为,血清、血浆、全血、尿液、唾液、胆汁、眼泪以及细胞组织的来自生物学供应源的生物样本。

[0041] (现有的质谱分析方法的说明)

[0042] 另一方面,在应用现有的质谱分析方法的维生素D测定方法中,分别对在血液中循环的25-OH D₃以及25-OH D₂的浓度进行定量。要定量时,预先添加已知浓度的稳定同位素物质,进行相对定量。质谱分析方法的处理工序如下所示。对生物样本添加已知量的内标物质、即25-OH D₃的稳定同位素标记物质(例如25-OH D₃-d6)以及25-OH D₂(例如25-OH D₂-d6)的稳定同位素标记物质。生物样本中的待测物质25-OH D₃以及25-OH D₂与DBP结合,因此,添加酸、碱或者还原剂使之游离出来。继而,预先通过生物素-亲和素结合等方式使特异

性识别待测物质的抗体与磁珠结合,使处理后的生物样本进行反应。利用磁体对结合有抗体的磁珠与待测物质结合而成的复合物进行集磁,清洗后添加酸、碱或者有机溶剂,将从抗体游离出来的待测物质及内标物质提供给质谱仪。定量25-OH D₃时,计算25-OH D₃与25-OH D₃-d₆的比率,预先对包含已知浓度的25-OH D₃的校准曲线用样本进行测定,以制作的校准曲线,使用制作得到的校准曲线计算25-OH D₃的浓度。25-OH D₂的浓度也按照同样的方法计算。

[0043] (组合情况下的说明)

[0044] 如图1所示,本实施例由以下工序构成:第1工序101,其利用抗原-抗体反应形成微粒与待测物质的复合物并纯化;第2工序102,其对经第1工序纯化后的复合物进行定量分离;第3工序103,其通过免疫学分析方法获取分离后的复合物总量信息;第4工序104,其从分离后的复合物洗脱待测物质及相似化合物,通过质谱分析方法获取待测物质与相似化合物的比率信息;以及第5工序105,其使用第3工序中获取的复合物总量和第4工序中获取的待测物质与相似化合物的丰度比,对待测物质进行准确定量。

[0045] 这里所谓的“抗原-抗体反应”定义为,利用抗原(待测对象成分)和抗体的结合反应,分离待测对象成分和杂质的方法。

[0046] (关于分析装置的说明)

[0047] 利用图2及3,说明本实施例的装置构成。本实施例的装置由以下部分构成:样本传送部201,其传送样本容器202;试剂传送部203,其传送试剂容器204;反应溶液传送部205,其传送进行各种反应的反应容器206;样本取样器207,其将样本从样本容器202抽吸、排出到反应容器206;试剂取样器208,其将各种试剂从试剂容器204抽吸、排出到反应容器206;反应溶液取样器209,其将在反应容器206内反应的复合物抽吸、排出到分离部210;分离部210,其将复合物定量分离为免疫学分析方法用复合物和质谱分析方法用复合物;质谱分析部211,其利用质谱仪对分离为质谱分析方法用的复合物进行测定;免疫学分析部212,其利用光学方法对分离为免疫学分析方法用的复合物进行测定;以及控制部213,其对构成本装置的各个部位进行自动统一控制以及数据处理。作为传送机构,以样本传送部201、试剂传送部203及反应容器传送部205在履带上输送的盘式为例进行说明,但并不限于此,也可以是沿X-Y轴输送的传送机构,或者带式输送机方式的传送机构。另外,虽未图示,但装置内还设置有在反应容器内进行各种反应时实施搅拌的搅拌部、清洗各种取样器的清洗部。

[0048] 样本容器202中存储有生物样本、本实施例中作为标本的血清或血浆、校准器样本以及QC(Quality Control,质量控制)样本。试剂容器204中存储有使作为待测物质的维生素D代谢物从DBP游离出来的试剂即1mol/L氢氧化钠、已结合抗体的磁珠以及作为清洗溶液的10mmol/L磷酸缓冲生理盐水(pH 7.4)。预先使用生物素302及亲和素303通过生物素-亲和素结合的方式使抗维生素D抗体304与磁珠301结合,从而构成已结合抗体的磁珠。本实施例中使用如下所述的已结合抗体的磁珠:利用生物素-亲和素反应,将Immunodiagnostik公司的10μg抗25-OH-D₃抗体与50μL呈浆状悬浮于10mmol/L磷酸缓冲生理盐水(pH 7.4)中的、直径为300nm的磁珠(相当于1mg)相结合。用于使待测物质从DBP游离出来的试剂除了如本实施例所示使用氢氧化钠以外,还可以使用甲酸、三氟乙酸作为酸,使用二硫苏糖醇、巯基乙醇作为还原剂,使用尿素、Tween20、TritonX-100、十二烷基硫酸钠作为变性剂。关于磁珠的表面改性,除了如本实施例所示使用通过开展生物素-亲和素反应的生物素进行表面改

性的磁珠以外,还可以使用通过羟基丁二酰亚胺基、1,1-羰基二咪唑基、proteinA、proteinG以及抗鼠抗体进行表面改性的磁珠。关于清洗溶液,除了如本实施例所示使用磷酸缓冲生理盐水以外,还可以使用三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液、HEPES缓冲液、水。

[0049] (关于第1工序的说明)

[0050] 以下对本实施例的测定流程进行说明。先对第1工序101进行说明。第1工序101利用抗原-抗体反应形成磁珠与待测物质的复合物,从而进行纯化。样本传送部201及反应容器传送部205旋转直至到达样本取样器207下的规定位置。然后,使用样本取样器207,从样本容器将100 μ L的血清(或者校准器样本或QC样本)抽吸、排出到反应容器206中。接着,试剂传送部203及反应容器传送部205旋转直至到达试剂取样器208下的规定位置。然后,使用试剂取样器208,从试剂容器204将20 μ L的1mol/L氢氧化钠抽吸、排出到存储有血清的反应容器206中。继而,使用试剂取样器208,从试剂容器204将50 μ L呈浆状悬浮于10mmol/L磷酸缓冲生理盐水(pH 7.4)中的已结合抗体的磁珠(相当于1mg)抽吸、排出到血清中添加有氢氧化钠的反应容器206中。然后,在常温下使生物样本中的待测物质与已结合抗体的磁珠在反应容器206内反应10分钟,形成待测物质与已结合抗体的磁珠结合而成的复合物。接着,反应容器传送部205旋转直至到达磁体214下的规定位置,使反应容器206内的复合物集磁后,使用试剂取样器208,从反应容器206抽吸反应溶液,并作为废液排出。试剂传送部203及反应容器传送部205旋转直至到达试剂取样器208下的规定位置。继而,使用试剂取样器208,从试剂容器204抽吸、排出200 μ L的10mmol/L磷酸缓冲生理盐水(pH 7.4),对复合物进行清洗,减少非特异性反应。进行3次该集磁-清洗操作。接着,反应溶液传送部205旋转直至到达反应溶液取样器209下的规定位置。继而,使用反应溶液取样器209,将反应容器206中的呈浆状悬浮于10mmol/L磷酸缓冲生理盐水(pH7.4)的复合物全量抽吸、排出到分离部210中。

[0051] (关于第2工序的说明)

[0052] 以下对第2工序102进行说明。第2工序102对经第1工序纯化后的复合物进行定量分离。参照图4对分离部210进行说明。分离部210由以下部分构成:注入器401,其将从反应容器取样器209排出的复合物导入分离部210;流路402;泵403,其位于注入器401的上游,将溶剂输送到流路402;主动分流器404,其位于流路402的下游,位于流路402的分叉处;粒子分布测定装置(例如,库尔特计数器)405,其能够实时测定注入器401和主动分流器404之间的流路402上的复合物量;质谱分析方法用流路406,其位于主动分流器404的下游,将复合物输送到质谱分析部211;以及免疫学分析方法用流路407,其位于主动分流器404的下游,将复合物输送到免疫学分析部212。测定复合物量所使用的粒子分布测定装置405将电解质溶液,在本实施例中为10mmol/L磷酸缓冲生理盐水(pH 7.4)输送到流路402内,对复合物通过库尔特计数器405内的细孔时电阻的变化进行测定,从而检测复合物量。分离部210具备计算机构,基于粒子分布测定装置405的测定值、从库尔特计数器405到主动分流器404的距离、流路402的内径、流过流路402内的电解质溶液的流速以及主动分流器404的切换时间,计算输送到质谱分析方法用流路406和免疫学分析方法用流路407的复合物量。

[0053] 在本实施例中,将从粒子分布测定装置405到主动分流器404的距离设定为30cm,将流路402的内径设定为0.2mm,将流过流路402的电解质溶液的速度设定为0.1mL/min,主动分流器404向免疫学分析方法用流路407方向打开6秒钟,输送复合物后切换为质谱分析方法用流路406,将等量的复合物分离到质谱分析方法用流路406和免疫学分析方法用流路

407。通过变更主动分流器404的切换时间,可以调整到达质谱分析方法用流路406及免疫学分析方法用流路407的复合物量。

[0054] (关于第3工序的说明)

[0055] 以下对第3工序103进行说明。第3工序103通过免疫学分析方法获取分离后的复合物总量信息。参照图5对免疫学分析部212进行说明。免疫学分析部212由以下部分构成:磁体501;免疫学分析方法用试剂容器502,其保存通过免疫学分析方法用流路407输送的复合物以及免疫学分析方法用试剂;免疫学分析方法用试剂传送部503,其传送免疫学分析方法用试剂容器502;免疫学分析方法用取样器504,其将免疫学分析方法用试剂从保管有免疫学分析方法用试剂的免疫学分析方法用试剂容器502抽吸、排出到保管有复合物的免疫学分析方法用试剂容器502;光源505,其对反应槽505中的复合物照射光线;以及测光器506。免疫学分析方法用试剂采用选择性地结合于第1抗体的第2抗体即抗球蛋白抗体。该第2抗体已做荧光标记,能够利用光谱法进行定量。

[0056] 以下对免疫学分析部212的测定流程进行说明。将通过免疫学分析方法用流路407输送的复合物保管于空的免疫学分析方法用试剂容器502中。免疫学分析方法用试剂传送部503旋转直至到达免疫学分析方法用取样器504下的规定位置。继而,使用免疫学分析方法用取样器504,从样本容器将50 μ L的溶解于10mmol/L磷酸缓冲生理盐水(pH 7.4)、已标记的第2抗体抽吸、排出到保管有复合物的免疫学分析方法用试剂容器502中。免疫学分析方法用试剂传送部503旋转直至到达磁体501下的规定位置,使复合物-第2抗体集磁,对复合物-第2抗体进行清洗。接着,免疫学分析方法用试剂传送部503旋转直至到达光源505下的规定位置,从光源505照射光线,并利用测光器506进行测光。在第3工序中,根据免疫学分析方法计算出在第2工序102中分离出的复合物的总量数据。对于本实施例中使用的ImmunDiagnostik公司的抗25-OH D₃抗体,在附件中记载道:100%的25-OH D₃、68%的25-OH D₂、100%的24,25-(OH)₂D₃、0.3%的维生素D₂会发生交叉反应。也就是说,使用结合有所述抗体的微粒与待测物质结合而成的复合物实施免疫学分析方法时,除作为待测物质的25-OH D₃以及25-OH D₂的总量以外,24,25-(OH)₂D₃以及维生素D₂也会结合,可以计算出构成复合物的25-OH D₃、25-OH D₂、24,25-(OH)₂D₃以及维生素D₂总量的定量值。

[0057] (关于第4工序的说明)

[0058] 以下对第4工序104进行说明。第4工序104从分离后的复合物洗脱待测物质以及相似化合物,通过质谱分析方法获取待测物质与相似化合物的比率信息。参照图6对质谱分析部211进行说明。质谱分析部211由以下部分构成:流路601,其和质谱分析方法用流路406连接;磁体602,其配置于流路601的管外侧,使复合物集磁;离子源603,其对待测物质施加高压力和高电压,使之离子化;以及质谱仪604。利用配置于流路601的管外侧的磁体602使被输送到流路601的复合物集磁,将流路601内的溶剂变更为洗脱溶剂即0.1%甘氨酸盐酸盐,从而使复合物中、与抗体结合的待测物质以及相似化合物游离出来,并导入离子源603中。在离子源603中离子化后,用质谱仪604测定质量数。关于洗脱溶剂,除了如本实施例所述使用甘氨酸盐酸盐以外,还可以使用甲酸等酸性水溶液、氢氧化钠等碱性水溶液以及甲醇等有机溶剂。在本实施例中,在离子源603中离子化的方法采用大气压化学离子化方法(APCI:Atomospheric Pressure Chemical Ionization)。至于其他离子化方法,还可以采用电喷射离子化方法(ESI:Electrospray Ionization)。在本实施例中,质谱仪604使用三重四级

杆质谱仪,利用SRM(Selected Reaction Monitoring,选择反应监测)模式对待测对象成分进行解析。质谱仪604还可以使用四级杆质谱仪、离子阱质谱仪等。基于从经第2工序102分离后的复合物游离出来的待测物质25-OH D₂、25-OH D₃、24,25-(OH)₂D₃以及维生素D₂的跃迁(transition),计算峰强度或者峰面积的数据。在本实施例中,使用三重四级杆质谱仪,利用Selected Reaction Monitoring(SRM)模式进行MS/MS分析,将各待测物质的跃迁设定如下:25-OH D₃为Q1/Q3=401.3/383.3,25-OH D₂为Q1/Q3=413.3/395.3,24,25-(OH)₂D₃为417.3/399.3,维生素D₂为397.3/379.3,获得峰强度的数据。各峰强度或者峰面积表示结合为复合物的25-OH D₂、25-OH D₃、24,25-(OH)₂D₃以及维生素D₂的丰度比。

[0059] 有时还会对从抗体游离出来的待测物质及相似化合物进行液液萃取或固相萃取的纯化或者衍生化处理。这里所谓的“固相萃取”定义为,在溶液或悬浮液(流动相)中所包含的溶质在固体(固定相)中流动的期间,利用各自的亲和性进行吸附或者直接流动,从而使待测对象成分和杂质分离的方法。“液液萃取”定义为,利用溶液或悬浮液(流动相)中所包含的溶质在其他溶剂中的溶解度差异(主要为水和非极性有机溶剂),使待测对象成分和杂质分离的方法。衍生化也可以采用如下方法:对从抗体游离出来的待测物质及内标物质添加cookson试剂,例如4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(PTAD)衍生化试剂进行衍生化,从而提高离子化效率。该情况下,将各待测物质的跃迁设定为:25-OH D₃-PTAD衍生物为Q1/Q3=576.3/298.3,25-OH D₂-PTAD衍生物为Q1/Q3=588.3/298.3,24,25-(OH)₂D₃-PTAD衍生物为592.3/298.3,维生素D₂-PTAD衍生物为572.3/298.3。这里所谓的“衍生化”定义为,对待测物质引入官能基、进行氧化、还原、原子取代等使之发生变化,但又不会大幅改变结构或性质。在MS灵敏度不足的情况下,为了提高离子化效率以及使待测物质的质量数变化到高质量区域,抑制杂质所造成的离子抑制,需要应用衍生化。衍生化试剂除PTAD以外,还包括例如1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(TAD)、4-氨基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(ATAD)、4-五氟苄基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(PFBTAD)、4-[4-(6-甲氧基-2-苯并恶唑基)苯基]-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(MBOTAD)以及4-[2-(6,7-二甲氧基-4-甲基-3-氧代-3,4-二氢喹噁啉基)乙基]-3,5-二酮(DMEQTAD)。

[0060] (关于第5工序的说明)

[0061] 参照图7对第5工序105进行说明。第5工序105使用第3工序中获取的复合物总量数据和第4工序中获取的待测物质与相似化合物的丰度比数据,对待测物质进行准确定量。在第3工序103中通过免疫学分析方法获取的定量值为30ng/mL。另一方面,在第4工序104中通过质谱分析方法获取的峰面积值为:25-OH D₃为1,404,000,25-OH D₂为1,170,000,24,25-(OH)₂D₃为25,740,维生素D₂为260。峰强度的丰度比为:25-OH D₃为54%,25-OH D₂为45%,24,25-(OH)₂D₃为0.99%,维生素D₂为0.01%。在第2工序102中设定为将等量的复合物分离到质谱分析方法用流路406和免疫学分析方法用流路407,被导入质谱分析部211和免疫学分析部212的复合物量相同。也就是说,如果使用在第3工序103中获取的定量值和在第4工序104中获取的峰强度的丰度比,计算25-OH D₂、25-OH D₃、24,25-(OH)₂D₃以及维生素D₂的准确定量值,则其结果为:25-OH D₃为16.2ng/mL,25-OH D₂为13.5ng/mL,24,25-(OH)₂D₃为0.297ng/mL,维生素D₂为0.003ng/mL。在第3工序103中通过免疫学分析方法获取的定量值30ng/mL表示25-OH D₂、25-OH D₃、24,25-(OH)₂D₃以及维生素D₂的总量,但如果在第5工序105中使用第3工序中获取的复合物总量数据和第4工序中获取的待测物质与相似化合物的丰

度比数据,计算待测物质的定量值,则能够获得准确的定量值。

[0062] 另外,本发明并不限于上述实施例,还包括各种改进例。例如,为了便于理解本发明,上述实施例进行了详细地说明,但并不一定要具备以上所说明的全部构成。此外,还可以将某一实施例的部分构成替换为其他实施例的构成,也可以对某一实施例的构成添加其他实施例的构成。对于各实施例的部分构成,可以追加、删除、替换其他构成。

[0063] 另外,例如可以通过集成电路设计等,由硬件实现上述各构成、功能、处理部、处理单元等的一部分或全部。也可以用处理器对用于实现各个功能的程序进行解释、执行,从而由软件实现上述各构成、功能等。用于实现各功能的程序、表格、文件等信息可以存储于存储器、硬盘、SSD(Solid State Drive,固态硬盘)等存储装置或者IC卡、SD卡、DVD等存储介质中。

[0064] 另外,说明时仅例示了说明所必要的控制线、信息线,并不一定会例示出产品中的所有控制线及信息线。但实际上几乎所有的构成都是互相连接的。

[0065] 以上,如本实施例所说明,本发明可以提供一种分析装置,其基于在第3工序103中获取的免疫学分析方法的定量值和在第4工序104中通过质谱分析方法获取的待测物质与相似化合物的峰强度比,计算定量值,从而能够消除免疫学测定方法的交叉反应性,在质谱分析方法中无需使用昂贵的内标物质。

[0066] 实施例2

[0067] 接下来,参照图8对本发明实施例2的分析装置进行说明。图8是说明本发明实施例2所记载的分析装置的一个实施方式所涉及的第2工序的图。对本实施例的分析装置的构成中,与实施例1不同的构成进行说明。本实施例的不同之处在于,在第2工序102的分离部210中,质谱分析方法用流路406和免疫学分析方法用流路407的流路切换中使用电磁体。和实施例1相比,本实施例仅第2工序102不同,其他工序都相同。以下对本实施例的分析装置的构成进行说明。

[0068] 本实施例中的分离部210由以下部分构成:注入器401,其将从反应容器取样器209排出的复合物导入分离部210;流路402;泵403,其位于注入器401的上游,将溶剂输送到流路402;库尔特计数器405,其设置于注入器401的下游以及设置于流路402的下游、分叉为2股的部位的上游;质谱分析方法用流路406,其是设置于流路402的下游、分叉为2股中的一侧流路,用于将复合物输送到质谱分析部211;免疫学分析方法用流路407,其为另一侧流路,用于将复合物输送到免疫学分析部212;电磁体801,其配置于质谱分析方法用流路406的管外侧;以及电磁体802,其配置于免疫学分析方法用流路407的管外侧。电磁体801及电磁体802的工作机制为:利用流过电磁体801及电磁体802的电流的导通/断开(ON/OFF)控制磁力,从而控制流过质谱分析方法用流路406及免疫学分析方法用流路407的复合物量。

[0069] 分离部210具备计算机构,基于粒子分布测定装置405的测定值、从粒子分布测定装置405到电磁体801及电磁体802的距离、流路402的内径、流过流路402内的电解质溶液的流速以及电磁体801及电磁体802的电流ON/OFF时间,计算输送到质谱分析方法用流路406和免疫学分析方法用流路407的复合物量。

[0070] 实施例3

[0071] 接下来,参照图9对本发明实施例3的分析装置进行说明。图9是说明本发明实施例3所记载的分析装置的一个实施方式所涉及的第2工序的图。对本实施例的分析装置的构成

中,与实施例1不同的构成进行说明。本实施例的不同之处在于,在第2工序102的分离部210中,测定复合物量所使用的粒子分布测定装置分别设置于质谱分析方法用流路406和免疫学分析方法用流路407中。和实施例1相比,本实施例仅第2工序102不同,其他工序都相同。以下对本实施例的分析装置的构成进行说明。

[0072] 本实施例中的分离部210由以下部分构成:注入器401,其将从反应容器取样器209排出的复合物导入分离部210;流路402;泵403,其位于注入器401的上游,将溶剂输送到流路402;主动分流器404,其位于流路402的分叉处;质谱分析方法用流路406,其位于主动分流器404的下游,将复合物输送到质谱分析部212;免疫学分析方法用流路407,其位于主动分流器404的下游,将复合物输送到免疫学分析部212,粒子分布测定装置901,其设置于质谱分析方法用流路406上;以及粒子分布测定装置902,其设置于免疫学分析方法用流路407上。

[0073] 分离部210具备计算机构,利用质谱分析方法用流路406及免疫学分析方法用流路407上所设置的粒子分布测定装置901及粒子分布测定装置902测定复合物量,计算导入质谱分析部211及免疫学分析部212的复合物量。

[0074] 实施例4

[0075] 接下来,参照图10对本发明实施例4的分析装置进行说明。图10是表示本发明实施例4所记载的分析装置的一个实施方式所涉及的概要构成的简图。对本实施例的分析装置的构成中,与实施例1不同的构成进行说明。本实施例的不同之处在于,在第2工序102的分离部210中,使用离线时专用的分离取样器1003,将复合物从反应容器206抽吸、排出到分离容器1002,从而实现分离。和实施例1相比,本实施例仅第2工序102不同,其他工序都相同。以下对本实施例的分析装置的构成进行说明。

[0076] 本实施例中的分离部210由以下部分构成:分离容器1002,其接收从反应容器取样器209排出的复合物;分离容器传送部1001,其传送分离容器1002;以及分离取样器1003,其从分离容器1002抽吸固定量的复合物,并导入质谱分析部211及免疫学分析部212。

[0077] 以下对本实施例的测定流程进行说明。反应容器传送部205及分离容器传送部1001旋转直至到达反应容器取样器209下的规定位置。然后,使用试剂取样器209,将呈浆状悬浮的复合物全量从反应容器206抽吸、排出到分离容器1002。继而,分离容器传送部1001旋转直至到达分离取样器1003下的规定位置,使用分离取样器1003,将固定量的复合物从分离容器1002导入质谱分析部211及免疫学分析部212。由于分离取样器1003可以抽吸、排出固定量复合物,因此,能够计算出导入质谱分析部211及免疫学分析部212的复合物量。

[0078] 实施例5

[0079] 接下来,对本发明实施例5的分析装置进行说明。本实施例的不同之处在于,使用结合有多种抗体的磁珠,同时测定多个待测物质。在本实施例中,对结合有抗三碘甲状腺原氨酸抗体(抗FT3抗体)的磁珠及结合有抗甲状腺素抗体(抗FT4抗体)的磁珠进行混合、测定。和实施例1相比,本实施例的不同之处在于使用结合有多种抗体的磁珠,其他工序都相同。首先,形成预先结合有抗体的磁珠和三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素及相似化合物结合而成的复合物。然后,利用分离部210将复合物分离到质谱分析部211和免疫学分析部212,测定复合物,从而利用质谱分析部211定量三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素及相似化合物的总量,利用免疫学分析部212测定三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素及相似化合物的峰强度比。根

据三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素及相似化合物的总量和峰强度比,定量三碘甲状腺原氨酸及甲状腺素。在本实施例中,通过计算减轻了抗体交叉反应性的三碘甲状腺原氨酸及甲状腺素的准确定量值,从而能够高精度地对甲状腺疾病的生物标志物成组地进行检查。此外,之前都是使用免疫学分析方法分别对三碘甲状腺原氨酸及甲状腺素进行测定,根据本实施例,则可以同时测定,提高了处理能力。

[0080] 标号说明

[0081] 101 第1工序

[0082] 102 第2工序

[0083] 103 第3工序

[0084] 104 第4工序

[0085] 105 第5工序

[0086] 201 样本传送部

[0087] 202 样本容器

[0088] 203 试剂传送部

[0089] 204 试剂容器

[0090] 205 反应溶液传送部

[0091] 206 反应容器

[0092] 207 样本取样器

[0093] 208 试剂取样器

[0094] 209 反应容器取样器

[0095] 210 分离部

[0096] 211 质谱分析部

[0097] 212 免疫学分析部

[0098] 213 控制部

[0099] 214 磁体

[0100] 301 磁珠

[0101] 302 亲和素

[0102] 303 生物素

[0103] 304 抗维生素D抗体

[0104] 305 待测物质

[0105] 306 相似化合物

[0106] 401 注入器

[0107] 402 流路

[0108] 403 泵

[0109] 404 主动分流器

[0110] 405 粒子分布测定装置

[0111] 406 质谱分析方法用流路

[0112] 407 免疫学分析方法用流路

[0113] 501 磁体

- [0114] 502 免疫学分析方法用试剂容器
- [0115] 503 免疫学分析方法用试剂容器传送部
- [0116] 504 免疫学分析方法用取样器
- [0117] 505 光源
- [0118] 506 测光部
- [0119] 601 流路
- [0120] 602 磁体
- [0121] 603 离子源
- [0122] 604 质谱仪
- [0123] 801 电磁体(免疫学分析方法用流路)
- [0124] 802 电磁体(质谱分析方法用流路)
- [0125] 1001 分离容器传送部
- [0126] 1002 分离容器
- [0127] 1003 分离取样器

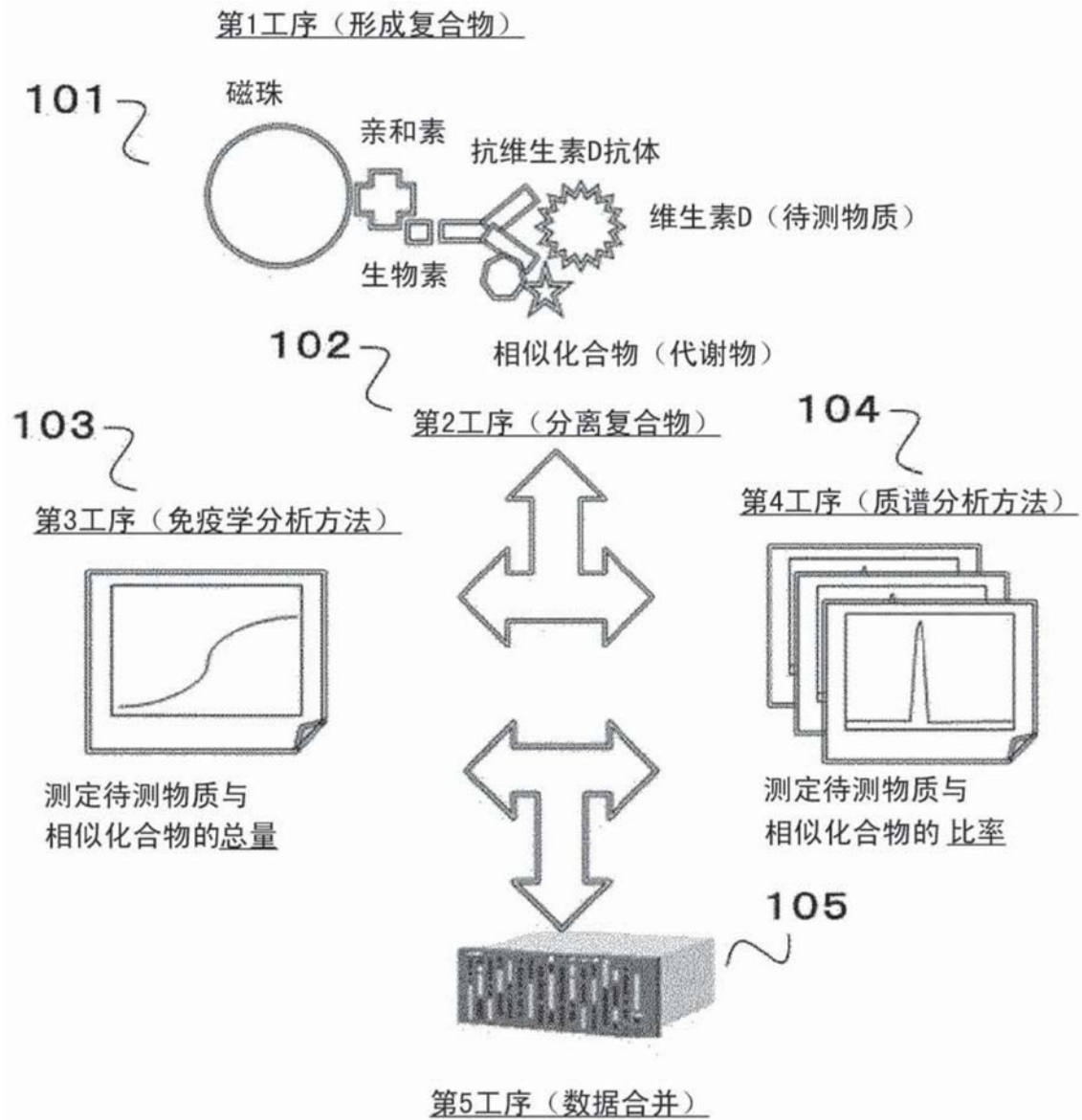


图1

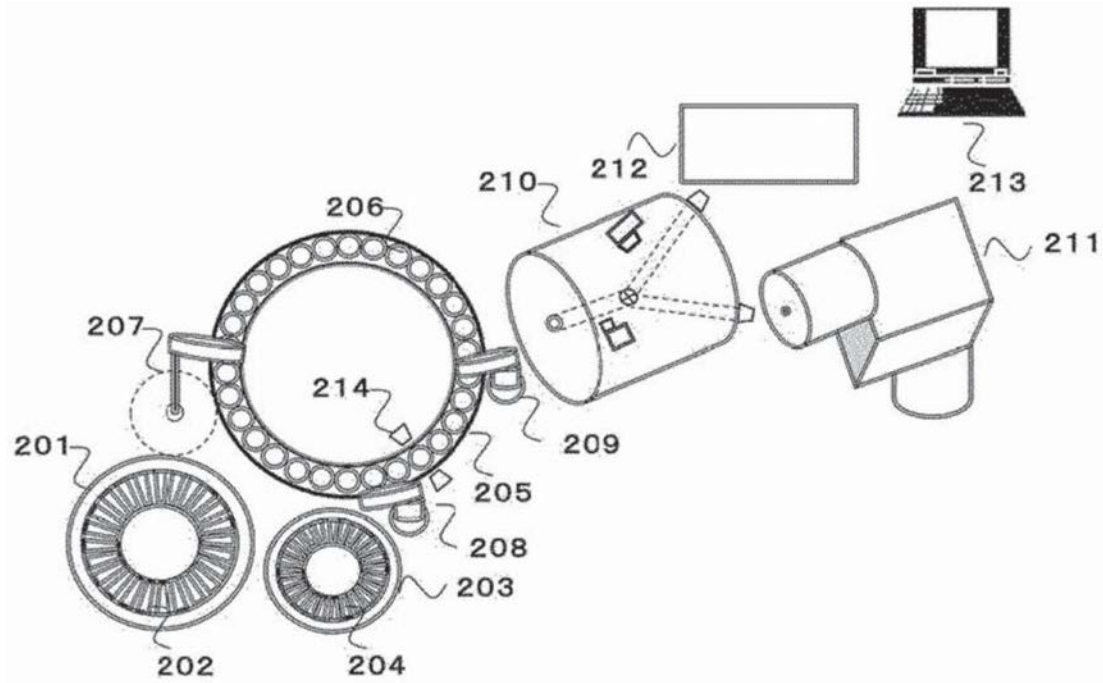


图2

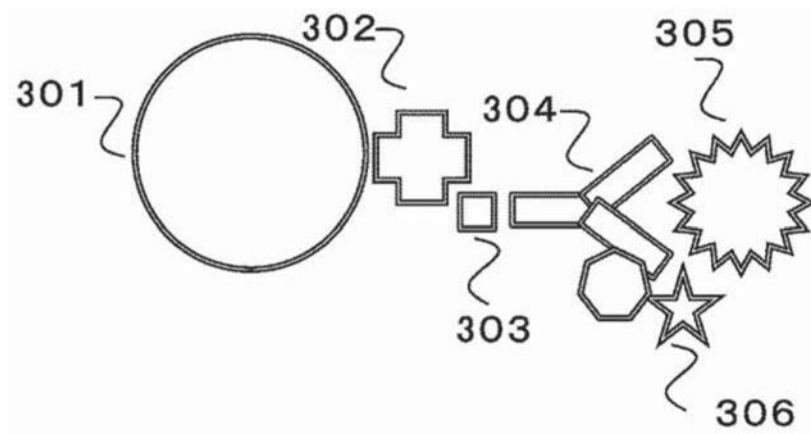


图3

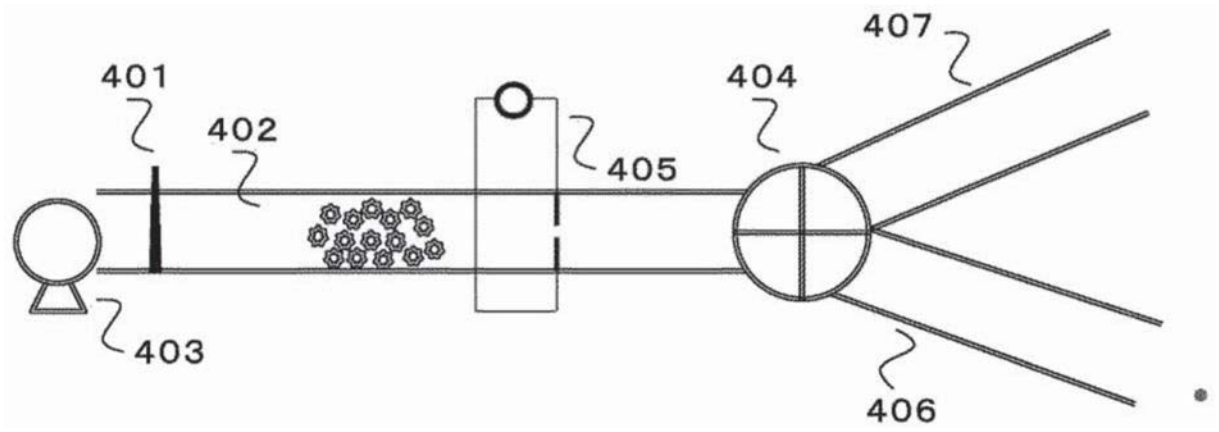


图4

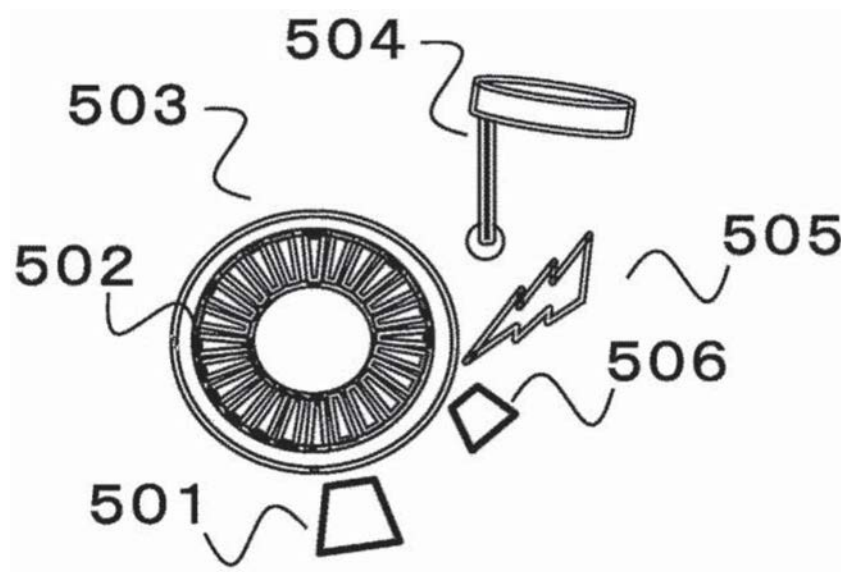


图5

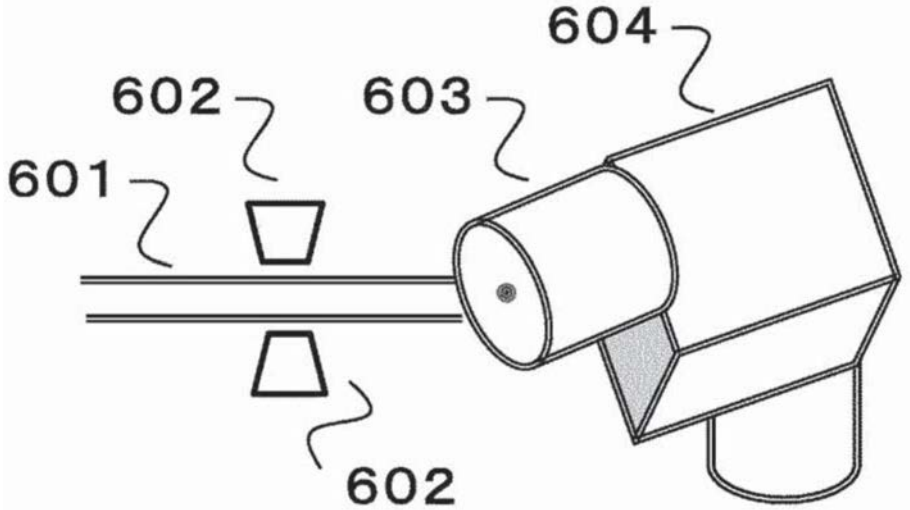


图6

成分	峰强度 (或者峰面积)	峰强度的 丰度比 (%)	免疫学分析部的 定量值30 ng/mL 的具体组成 (ng/mL)
25-OH D ₃	1, 404, 000	54	16. 2
25-OH D ₂	1, 170, 000	45	13. 5
24, 25-(O H) ₂ D ₃	25, 740	0. 99	0. 297
维生素 D ₂	260	0. 01	0. 003

图7

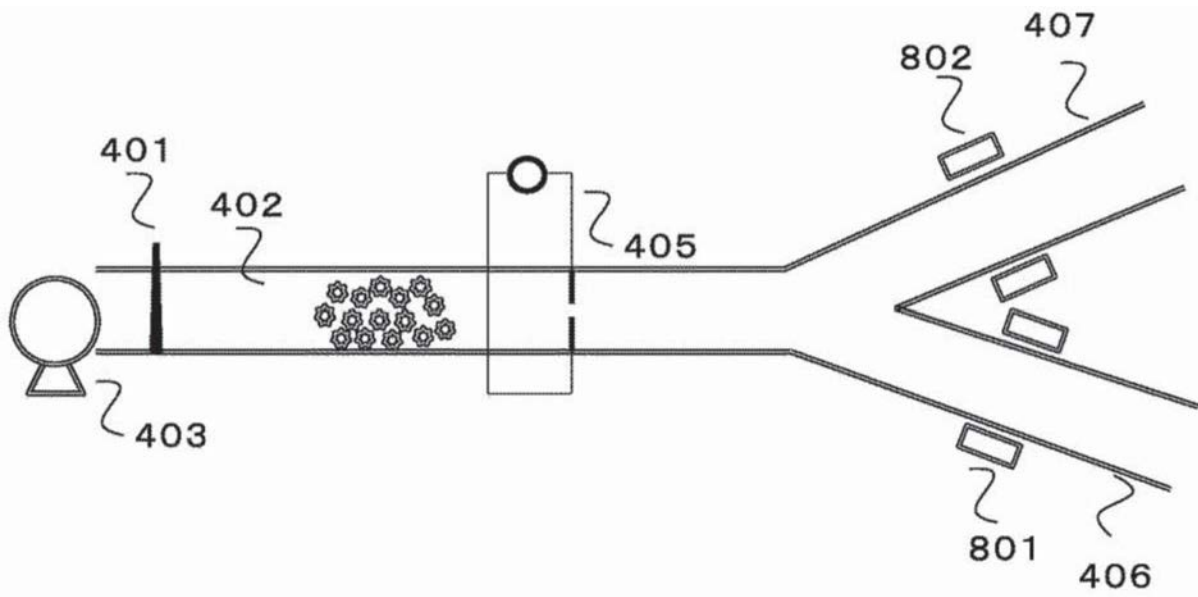


图8

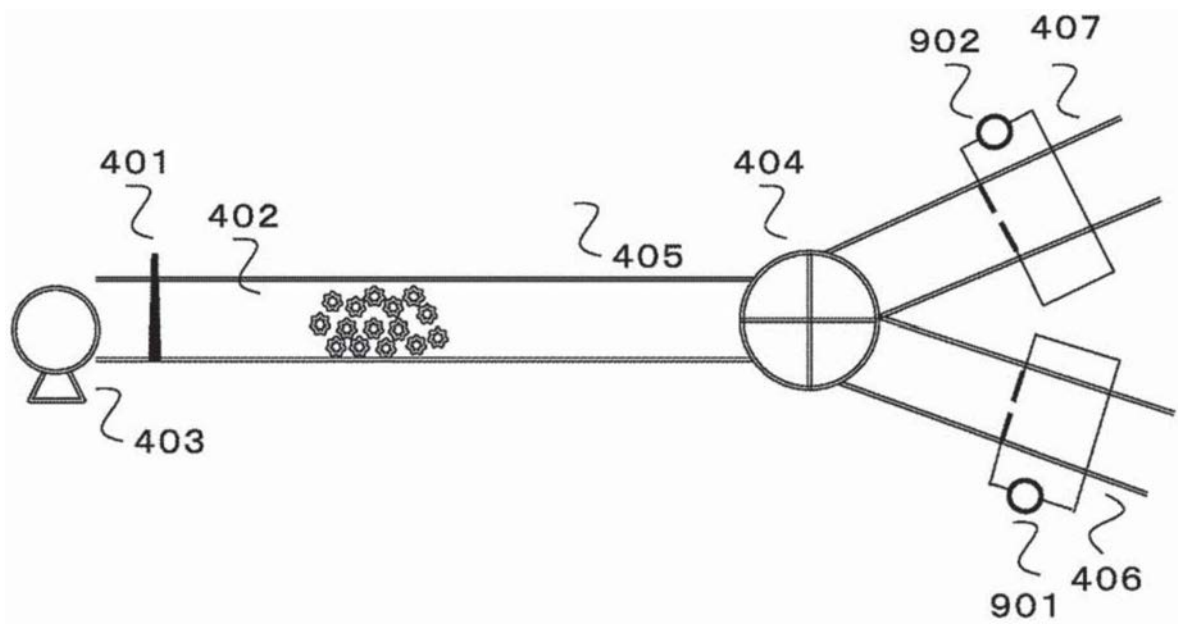


图9

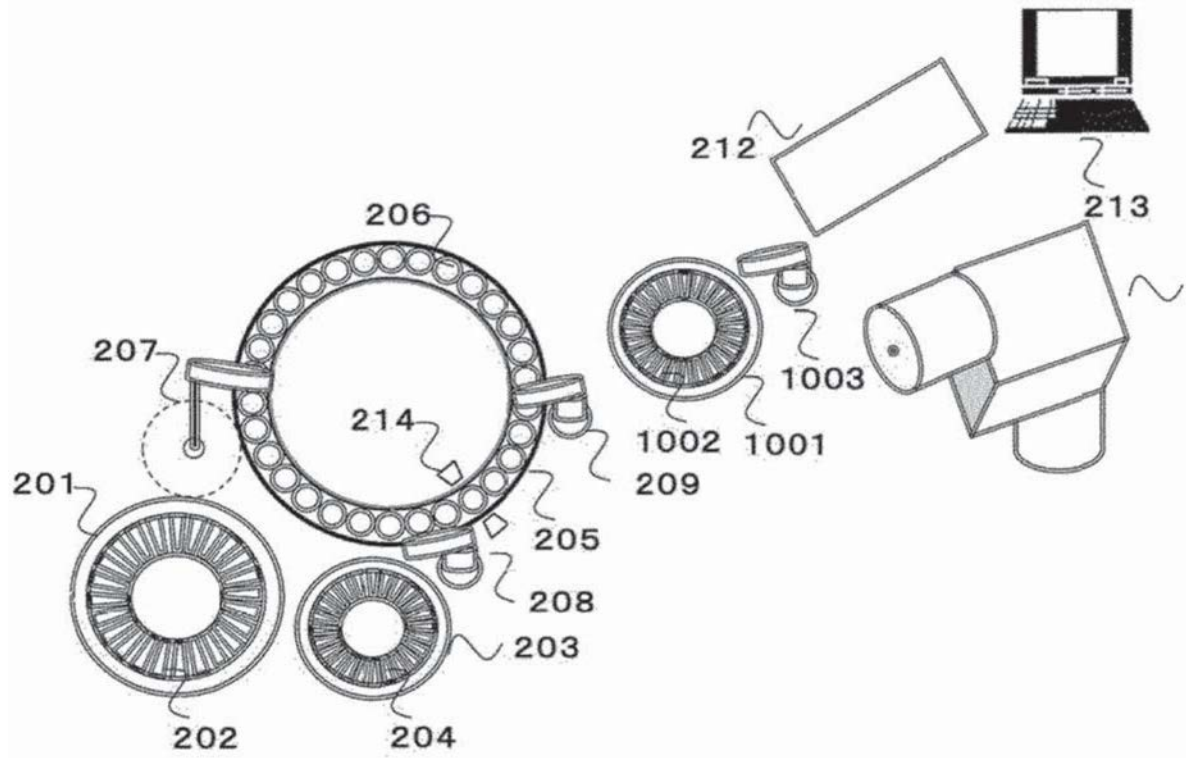


图10

专利名称(译)	分析装置以及分析方法		
公开(公告)号	CN106574934B	公开(公告)日	2019-01-04
申请号	CN201580037164.4	申请日	2015-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日立高新技术		
申请(专利权)人(译)	株式会社日立高新技术		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社日立高新技术		
[标]发明人	野上真 伊藤伸也 薮原忠雄		
发明人	野上真 伊藤伸也 薮原忠雄		
IPC分类号	G01N35/10 G01N15/12 G01N27/62 G01N33/53		
CPC分类号	G01N15/12 G01N33/54326 G01N33/82 G01N35/025 G01N35/08 G01N35/1095 G01N2015/0065 G01N27/62 G01N33/53 G01N35/10 G01N15/1209 G01N30/7233		
审查员(译)	王奇云		
优先权	2014139281 2014-07-07 JP		
其他公开文献	CN106574934A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

在具备免疫学分析方法和质谱分析方法的情况下，由于流入免疫学分析方法用流路的复合物以及流入质谱仪用流路的复合物的量未知，因此，即便对通过免疫学分析方法所获得的信息和通过质谱分析方法所获得的信息进行合并，仍然无法准确地定量待测物质，其中，所述免疫学分析方法中利用抗原-抗体反应形成微粒与待测物质的复合物并纯化，然后利用光谱法进行测定，所述质谱分析方法中利用抗原-抗体反应形成微粒与待测物质的复合物并纯化，然后用质谱仪进行测定。本发明具有在形成复合物后、在质谱分析方法用流路和免疫学分析方法用流路上定量复合物的机构。

