



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104363820 B

(45)授权公告日 2019.07.05

(21)申请号 201380031614.X

(22)申请日 2013.06.14

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104363820 A

(43)申请公布日 2015.02.18

(30)优先权数据  
12172251.6 2012.06.15 EP  
61/660,016 2012.06.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.12.15

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2013/062366 2013.06.14

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/186357 EN 2013.12.19

(73)专利权人 弗雷森纽斯医疗护理德国有限责  
任公司

地址 德国巴特洪堡

(72)发明人 阿尔弗雷德·加格尔  
安德列亚斯·迈尔霍费尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限  
公司 11227

代理人 郑斌

(51)Int.Cl.

A61B 5/00(2006.01)

A61B 5/145(2006.01)

A61B 5/1455(2006.01)

A61M 1/14(2006.01)

审查员 薛艳华

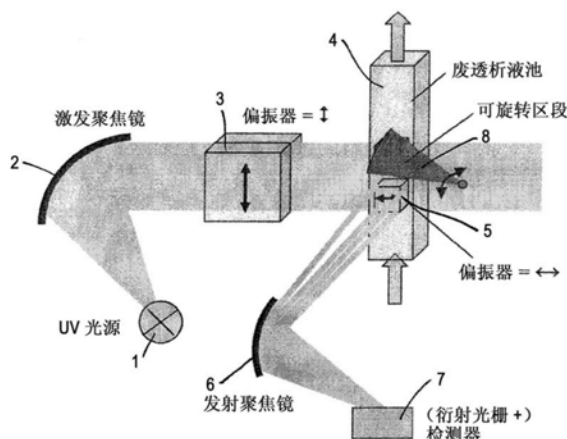
权利要求书3页 说明书12页 附图6页

### (54)发明名称

用于监控患者的体外血液处理的方法和装  
置

### (57)摘要

本发明涉及用于监控患者的透析处理的方法,所述方法优选用于监控患者的血液透析、血液透析滤过和/或腹膜透析处理,所述方法包括以下步骤:-利用线性偏振照射光对用于所述透析处理中的透析液体样品进行照射;-检测由所述透析液体发射出的荧光在第一偏振面中的强度;-检测由所述液体样品发射出的荧光在第二偏振面中的强度,所述第二偏振面不同于所述第一偏振面;-确定由透析液体发射出的荧光的各向异性;以及-基于所确定的由透析液体发射出的荧光的各向异性和强度这二者来确定所述透析液体中至少一种荧光团的浓度。



1. 一种用于在线监控患者的治疗过程中的透析、血液透析滤过和/或血液滤过处理的装置,所述装置包括:照射光源(1),其布置成在透析器或过滤器的下游侧利用线性偏振光对所述透析或滤过处理中所用的液体样品进行照射;以及检测器(7),其布置成在透析器的下游侧对由所述液体样品发出的荧光在第一偏振面和第二偏振面中的强度进行检测,其中所述第二偏振面不同于所述第一偏振面,其中设置有在线分析单元(A),其用于确定由所述液体样品发出的荧光的各向异性、并且用于通过基于所确定的由所述液体样品发出的荧光的各向异性和强度从而确定所述液体样品中至少一种荧光团的浓度。

2. 根据权利要求1所述的装置,其中所述透析是血液透析和/或腹膜透析。

3. 根据权利要求1所述的装置,其中在所述液体样品和用于检测荧光强度的所述检测器(7)之间设有至少两个偏振器(5,5'),这两个偏振器的偏振面之间呈一定的角度,其中在光路径中设有可移动的光闸(8)以交替覆盖两个所述偏振器(5,5')中的一者,从而交替地检测上述两个偏振面中的荧光强度。

4. 根据权利要求3所述的装置,其中在穿过所述液体样品的光源透射光的光路径中存在旋转光闸,使得能够通过一个检测器便能检测到所述透射光的强度以及至少两个不同的偏振面中的所述荧光强度。

5. 根据权利要求4所述的装置,其中在上述液体样品的相对的两侧布置了第一检测器和第二检测器,从而同时检测第一偏振面和第二偏振面的荧光,其中所述第一检测器连带有具有第一偏振面的偏振器(5),所述第二检测器连带有具有第二偏振面的偏振器(5'),其中该第二偏振面不同于该第一偏振面。

6. 根据权利要求1所述的装置,其中在与所述照射光源共轴的方向上布置有第三检测器(9),并将所述液体样品放置到该检测器与上述照射光源之间以检测透射强度。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述装置被构造成进行一种用于监控患者的透析、血液透析滤过和/或血液滤过处理的方法。

8. 根据权利要求7所述的装置,其中所述透析是血液透析和/或腹膜透析。

9. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述第一偏振面和所述第二偏振面是彼此垂直取向的,并且所述分析单元(A)被构造成基于以下等式来确定各向异性A:

$$A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}}$$

其中 $I_{vv}$ 是所检测到的在垂直偏振面中的荧光强度, $I_{vh}$ 是所检测到的在水平偏振面中的荧光强度,并且G是装置常数,其用于修正所述装置在检测所述第一偏振面和所述第二偏振面的强度时的灵敏度差异。

10. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述检测器(7)被构造成当在预定的照射波长下照射所述液体样品时,在预定的检测波长下检测所述荧光的强度,并且所述分析单元(A)被构造成利用所述各向异性来确定各荧光团,并利用所述荧光的强度来确定所述各荧光团的浓度。

11. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述检测器(7)被构造成当在预定的照射波长下照射所述液体样品时,在预定的检测波长下检测所述荧光的强度,并且所述分析单元(A)被构造成利用所述各向异性来确定各荧光团,并利用所述荧光的强度来确定所述各荧光团的浓度,其中各荧光团的所述各向异性是已知的。

12. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述分析单元 (A) 被构造成基于由以下等式表示的求和光谱的总各向异性 $A_{total}$ 来确定存在于所述液体样品中至少两种荧光团的浓度:

$$A_{total} = \sum_i f_i * A_i,$$

$$\text{其中 } f_i = \frac{S_i}{S_{total}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,total} + 2 * G * I_{vh,total}},$$

其中 $A_{total}$ 是求和光谱的总各向异性, $A_i$ 是第*i*个荧光团的各向异性, $f_i$ 是第*i*个荧光团相对于总强度的强度分数, $S_i$ 是第*i*个荧光团的物理照射的总强度, $S_{total}$ 是所有荧光团的物理照射的总强度, $I_{vh,i}$ 是所检测到的第*i*个荧光团的水平荧光强度, $I_{vv,i}$ 是所检测到的第*i*个荧光团的垂直荧光强度, $I_{vh,total}$ 是所检测到的所有荧光团的总水平荧光强度,并且 $I_{vv,total}$ 是所检测到的所有荧光团的总垂直荧光强度。

13. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述分析单元 (A) 被构造成基于由以下等式表示的求和光谱的总各向异性 $A_{total}$ 来确定存在于所述液体样品中至少两种荧光团的浓度:

$$A_{total} = \sum_i f_i * A_i,$$

$$\text{其中 } f_i = \frac{S_i}{S_{total}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,total} + 2 * G * I_{vh,total}},$$

其中 $A_{total}$ 是求和光谱的总各向异性, $A_i$ 是第*i*个荧光团的各向异性, $f_i$ 是第*i*个荧光团相对于总强度的强度分数, $S_i$ 是第*i*个荧光团的物理照射的总强度, $S_{total}$ 是所有荧光团的物理照射的总强度, $I_{vh,i}$ 是所检测到的第*i*个荧光团的水平荧光强度, $I_{vv,i}$ 是所检测到的第*i*个荧光团的垂直荧光强度, $I_{vh,total}$ 是所检测到的所有荧光团的总水平荧光强度,并且 $I_{vv,total}$ 是所检测到的所有荧光团的总垂直荧光强度,其中第*i*个荧光团的各向异性 $A_i$ 是已知的。

14. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述照射光源 (1) 被构造成在所述治疗过程中在线持续照射不同液体样品, 并且所述检测器 (7) 被构造成持续检测所述不同样品的所述荧光强度。

15. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述分析单元 (A) 被构造成基于总各向异性直接确定荧光团的浓度。

16. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述分析单元 (A) 被构造成基于总各向异性直接确定荧光团的浓度, 其中基于所述总各向异性来确定白蛋白的浓度。

17. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述分析单元 (A) 被构造成基于所检测的荧光的垂直强度和水平强度从而直接确定荧光团的浓度。

18. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述分析单元 (A) 被构造成基于所检测的荧光的垂直强度和水平强度从而直接确定人白蛋白的荧光团的浓度。

19. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置, 其中所述照射光源 (1) 被构造成利用线性的脉冲偏振照射光来照射所述液体样品, 并且所述检测器 (7) 被构造成以时间分辨的方式进行所述第一偏振面和所述第二偏振面中的所述荧光的检测, 并且

$$A=A_0*e^{-t/\theta},$$

其中 $\theta$ 是旋转相关时间,其是用于描述下述时间段的特征时间常数:在该时间段内,跃迁偶极矩的轴通过分子旋转从而以扩散的方式发生取向,并且 $A_0$ 是在偏振作用施加之前,时间点 $t=0$ 时的各向异性。

20. 根据权利要求19所述的装置,其中所述装置被构造成通过改变所述液体样品的温度、改变所述液体样品的粘度、以及/或者施加外部磁场和/或电场来改变所述旋转相关时间。

21. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述装置被构造成通过施加外部电场和/或磁场来使所述液体样品的跃迁偶极矩取向,从而提高总荧光强度。

22. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中对测量得到的各向异性光谱进行矩阵分解,并与已知物质的各向异性光谱进行比对,从而基于所述已知物质各自的强度来确定所述已知物质各自的浓度。

23. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述分析单元(A)被构造成基于所检测出的水平强度减去所检测出的垂直强度的减法运算来确定所述样品中人白蛋白的浓度。

24. 根据权利要求1-6中任一项所述的装置,其中用于体外血液处理的液体为用于患者的透析和/或血液透析滤过处理中的透析液或用于患者的血液滤过处理中的超滤液。

25. 根据权利要求24所述的装置,其中所述透析是血液透析和/或腹膜透析。

26. 一种用于对患者进行体外血液处理的体外血液处理设备,其中所述设备包括用于在治疗过程中在线监控患者的体外血液处理的装置,该装置包括:照射光源(1),其布置成在透析器或过滤器的下游侧利用线性偏振光对透析或滤过处理中所用的液体样品进行照射;以及检测器(7),其布置成在透析器的下游侧对由所述液体样品发出的荧光在第一偏振面和第二偏振面中的强度进行检测,其中所述第二偏振面不同于所述第一偏振面,其中设置有在线分析单元(A),其用于确定由所述液体样品发出的荧光的各向异性、并且用于通过基于所确定的由所述液体样品发出的荧光的各向异性和强度从而确定所述液体样品中至少一种荧光团的浓度,其中在与所述照射光源共轴的方向上布置有第三检测器(9),并将所述液体样品放置到该检测器与所述照射光源之间以检测透射强度。

27. 一种用于对患者进行体外血液处理的体外血液处理设备,所述设备用于对患者进行透析、血液透析滤过和/或血液滤过处理,其中所述设备包括用于在治疗过程中在线监控患者的体外血液处理的装置,该装置包括:照射光源(1),其布置成在透析器或过滤器的下游侧利用线性偏振光对所述透析或滤过处理中所用的液体样品进行照射;以及检测器(7),其布置成在透析器的下游侧对由所述液体样品发出的荧光在第一偏振面和第二偏振面中的强度进行检测,其中所述第二偏振面不同于所述第一偏振面,其中设置有在线分析单元(A),其用于确定由所述液体样品发出的荧光的各向异性、并且用于通过基于所确定的由所述液体样品发出的荧光的各向异性和强度从而确定所述液体样品中至少一种荧光团的浓度,其中在与所述照射光源共轴的方向上布置有第三检测器(9),并将所述液体样品放置到该检测器与所述照射光源之间以检测透射强度。

28. 根据权利要求27所述的体外血液处理设备,其中所述透析是血液透析和/或腹膜透析。

## 用于监控患者的体外血液处理的方法和装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于监控患者的体外血液处理的方法和装置,优选用于监控患者的透析、血液透析、血液透析滤过(haemodiafiltration)、血液滤过(haemofiltration)和/或腹膜透析处理。

### 背景技术

[0002] 透析是最常见和最常用的体外血液处理法之一,其旨在当患者的肾发生肾功能衰竭时来取代肾的功能。

[0003] 当肾功能衰竭时,必须对患者进行透析以除去患者血液中的废弃产物,例如尿素、肌氨酸酐和尿毒症性毒素。此外,在透析期间,通常通过尿液排出的过多的水和其他物质也被从患者的血液中除去。透析中最常用的方法是血液透析,其中患者的血液沿着透析膜流动,其中在该透析膜的另一侧为透析液。因此,血液和透析液被多孔膜隔开。

[0004] 通过使用这样的膜,由于在血液和透析液之间存在浓度梯度,因此将从患者血液中除去的物质发生扩散。较大的分子的扩散速度非常慢,这样的分子也能够借助液体流以对流的方式由膜的血液侧传送至膜的透析液侧。

[0005] 将透析液制备成具有如下浓度:该浓度针对某些物质而未必针对全部物质提供从血液侧至透析液侧的浓度梯度。实际上,期望除去人身体里的尿素和肌氨酸酐以及其他废物,但是,例如,完全不期望除去电解质(例如钾、钠或碳酸氢盐)或改变电解质的浓度,这被认为是有害的。因此,透析液中所包含的电解质的浓度通常类似于患者的血浆中的电解质浓度,使得不存在这些物质的浓度梯度。

[0006] 除血液透析以外,腹膜透析是另一种透析法,其也使用膜和透析液以实现废物扩散通过膜并进入透析液。然而,该膜是天然膜,即腹膜,并且透析液被直接引进腹腔中。

[0007] 在透析期间,除去多余水分和小分子的尿毒症物质(例如尿素和肌氨酸酐)通常没有问题,然而,较大的分子较难通过多孔膜除去。为了解决该问题,提供了与高度对流的方法(例如血液透析滤过)相结合的特定高通量透析膜。这提高了分子量超过1kDa(所谓的中型分子的范围)的分子的清除率。在血液透析滤过中,将以上述形式来使用透析液的扩散法与其中患者的血液经受过滤器两侧的压力梯度的血液滤过相结合。因此,沿着压力梯度的过滤过程导致液体流增加,并且因此,该过滤过程被认为是使得能够除去相当大部分的中型分子的高度对流的方法。然而,由于压力梯度,也以高速率从患者的血液中除去水分以及电解质和糖,使得必须借助于注射置换液来代替这些血液成分。

[0008] 采用与高度对流的方法结合的高通量透析膜提高了中型分子和较大分子的清除率。

[0009] 较大分子通常是蛋白质,其中例如 $\beta$ 2-微球蛋白的尺寸为约11kDa,其中,该分子在没有被充分除去的情况下会引起淀粉样变性。有毒的较小分子在与蛋白质结合的情况下也可能难以进行透析。例如,与蛋白质结合的尿毒症毒素为硫酸对甲酚和硫酸吡啶酚。

[0010] 因此,期望透析膜具有足够大的孔尺寸以允许这些中型分子通过。另一方面,膜的

孔尺寸不能无限扩大,这是因为膜的孔尺寸越大,丢失维持生命所必需的血液组分的风险也同样会越高。因此,膜的渗透性通常限制在尺寸为约60kDa。然而,该值仅略低于尺寸为约66kDa的人血浆白蛋白的分子质量。实际上,在临床上可能出现显著的白蛋白丢失,其中,这些丢失显著地取决于该方法的各个参数,例如透析液中各自的压力和各自的浓度。特别地,与在血液滤过期间所施加的压力梯度结合的高通量膜提高了人白蛋白的清除率。人白蛋白丢失的另一原因可能是膜的多次使用,这是因为在不同处理之间所必需的膜的清洗易于增加膜的孔尺寸。这将膜的渗透性移向较大的分子。因此,即使在正常血液滤过的正常条件下,人血清白蛋白也可以穿透该膜。

[0011] 毫无疑问,在腹膜透析的情况下,膜的孔尺寸不受影响,而是由各个患者的腹膜的情况来确定。然而,一旦腹膜已经由于例如炎症而受损,则仍然可能出现人白蛋白进入透析液而丢失。

[0012] 为了确定透析期间分析物的清除率,在美国专利文献US 2008/0158544A1中公开了拉曼光谱法,其中,在血液已经通过透析器之后,对血液进行拉曼光谱测量,以利用诸如尿素之类的一种或更多种分析物的独特的拉曼光谱信号来对整个血液背景进行这种分析物的识别和量化。

[0013] 专利文献W0 2010/091826 A1涉及用于血液的体外治疗的设备,其中,测量透析液中电磁辐射的吸收,以确定 $Kt/V$ 值,即清除物质的容积流的清除率 $K$ ,其中, $t$ 是处理时间,并且 $V$ 是患者的分布容积。在肾脏替代治疗中,通常将尿素用作用于测量尿酸的处理效率的标记物,使得 $K$ 为尿酸清除率,并且 $V$ 是患者的尿素分布容积,原则上, $V$ 相当于患者的体内水分。然而,通常不能通过测量总吸收来确定特定分子的清除率。

[0014] 因此,希望在透析处理期间监控人白蛋白的丢失,从而使医护人员注意到这种情况,使得在白蛋白过度丢失的情况中对该处理进行调节或者甚至自动调节、或者甚至中断处理。

[0015] 此外,也要对诸如上述中等大小的分子(尺寸小于66kDa的蛋白质)等其他蛋白质以及更小的分子物质(例如对甲苯基硫酸盐、羟基吡啶硫酸盐或苯酚)的清除率进行确定,因为这些物质是有毒的。

## 发明内容

[0016] 因此,本发明的目的是提供一种用于对患者的体外血液处理进行监控的方法和装置。

[0017] 该目的是通过权利要求1所述的方法来解决的。可在从属权利要求中获得有利的实施方案。

[0018] 因此,对于用于对患者的体外血液处理进行监控的方法,优选用于监控患者的透析、血液透析、血液透析滤过、血液滤过和/或腹膜透析处理的方法包括以下步骤:利用线性偏振照射光对用于体外血液处理的液体样品进行照射;检测由所述液体样品发出的荧光在第一偏振面中的强度;检测由所述液体样品发出的荧光在第二偏振面中的强度,其中所述第二偏振面与所述第一偏振面不同;确定由所述液体样品发出的荧光的各向异性;并且基于所确定的由所述液体样品发出的荧光的各向异性和强度这二者,从而确定所述液体样品中至少一种荧光团的浓度。

[0019] 通过基于所测量的偏振荧光的各向异性和强度来确定液体样品中各荧光团的浓度,可以将所述液体样品中的多种荧光活性物质的荧光信号区别开。实际上,通过利用用以确定液体样品中单一荧光团的各自浓度的各向异性,可以确定液体样品中各荧光团各自的浓度,这是因为每种荧光团的各向异性都是不同的。

[0020] 在患者的透析、血液透析、血液透析滤过和/或腹膜透析处理中,体外血液处理中使用的液体可以是透析液,或者在患者的血液滤过处理中,所用的液体可以是超滤液。

[0021] 通过利用荧光光谱的这种变量,可以在治疗过程中在线确定(例如)对流透析处理的性能。例如,可以通过对透析液的成分进行分析来确定其性能。如果特定分子的清除率低于特定极限值或者如果诸如人白蛋白之类的物质以不可接受的量被从患者的血浆中除去,那么可以通过处理装置来自动调节处理过程和/或发出警报。

[0022] 优选的是,第一偏振面和第二偏振面的取向方向彼此垂直,并且基于以下等式来确定各向异性A:

$$[0023] \quad A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}}$$

[0024] 其中 $I_{vv}$ 是在垂直偏振面中检测到的荧光强度, $I_{vh}$ 是在水平偏振面中检测到的荧光强度,并且G是装置常数,以修正装置在检测第一偏振面和第二偏振面中的强度时产生的灵敏度差异。由于不同的荧光团表现出不同的各向异性,因此各向异性可用来精确地确定荧光团。

[0025] 在另一个优选的实施方案中,当在预定的照射波长下对样品进行照射时,在预定的检测波长下来检测荧光的强度,并且利用各向异性来确定单一的荧光团,利用荧光的强度来确定该单一荧光团的浓度,其中优选的是,特定的单一荧光团的各向异性是已知的。

[0026] 优选的是,基于以下等式来确定液体样品中存在的至少两种荧光团的浓度,该等式是求和光谱的总各向异性 $A_{total}$ :

$$[0027] \quad A_{total} = \sum_i f_i * A_i$$

$$[0028] \quad \text{其中 } f_i = \frac{S_i}{S_{total}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,total} + 2 * G * I_{vh,total}}$$

[0029] 其中 $A_{total}$ 是求和光谱的总各向异性, $A_i$ 是第i个荧光团的各向异性, $f_i$ 是第i个荧光团相对于总强度的强度分数, $S_i$ 是第i个荧光团的物理照射的总强度, $S_{total}$ 是所有荧光团的物理照射的总强度, $I_{vh,i}$ 是所检测到的第i个荧光团的水平荧光强度, $I_{vv,i}$ 是所检测到的第i个荧光团的垂直荧光强度,以及i是相对于所有荧光团的指数,其中第i个荧光团的各向异性 $A_i$ 优选是已知的。基于此,基于所检测到的荧光,可以确定液体样品中至少两种荧光团的浓度。换言之,可以区分出液体样品(例如透析液或超滤液)中不同的各荧光团。

[0030] 此外,优选对液体样品进行持续照射并持续进行检测。按照这样的方式,可以容易地观察到不同液体样品中浓度的变化。术语“持续”应当被理解为在患者的体外血液处理过程中包括短时间的测量过程中断,例如体外血液处理装置的组建(set-up)或调节过程。

[0031] 优选的是,基于总各向异性直接确定荧光团的浓度,其中优选的是基于总各向异性来确定白蛋白的浓度。如果荧光团对总各向异性的贡献是显著的,那么这种做法是特别有利的。

[0032] 在优选的实施方案中,基于所检测荧光的垂直强度和水平强度来直接确定荧光团的浓度、优选人白蛋白的浓度。再次强调的是,当荧光团对透析液的总各向异性有显著贡献时,这是特别适合的。基于这样的方法,可以非常容易地进行浓度的确定。

[0033] 在另一个优选的实施方案中,用线性的脉冲偏振照射光对液体样品进行照射,并且以时间分辨的方式(time-resolved fashion)进行第一偏振面和第二偏振面中的荧光检测,按照如下等式确定各向异性:

$$[0034] \quad A = A_0 * e^{-t/\theta}$$

[0035] 其中, $\theta$ 是旋转相关时间,其是用于描述下述时间段的特征时间常数,在该时间段内,跃迁偶极矩的轴通过分子旋转以扩散的方式发生取向,并且 $A_0$ 是在偏振作用施加之前,时间点 $t=0$ 时的各向异性。各向异性的旋转相关时间 $\theta$ 可以用于确定荧光团的物质,这是因为每种荧光团具有不同的旋转相关时间 $\theta$ 。

[0036] 优选的是,通过改变液体样品的温度、改变液体样品的粘度、以及/或者施加外部磁场和/或电场来改变旋转相关时间 $\theta$ ,从而基于旋转相关时间 $\theta$ 的行为来进一步识别荧光团。

[0037] 在一个优选的实施方案中,通过施加外部电场和/或磁场来使样品的跃迁偶极矩取向,从而提高总荧光强度。施加外部场有助于提高所检测到的强度,由此提高信噪比。

[0038] 优选的是,对测量得到的各向异性光谱进行矩阵分解(matrix decomposition),并与已知物质的各向异性光谱进行比对,从而基于已知物质各自的强度来确定这些物质各自的浓度。在此基础上,甚至对液体样品的实际组成的复杂荧光光谱的叠加也能进行分析。

[0039] 优选在患者的透析、血液透析、血液透析滤过和/或腹膜透析处理的过程中对新鲜透析液做参比测量(reference measurement),使得初始透析液中的杂质对由所用透析液获得的读数的影响能够被消除。该方法优选使用以下步骤:利用线性偏振照射光对将用于体外血液处理的新鲜透析液样品进行照射;检测由新鲜透析液样品发出的荧光在第一偏振面中的强度;检测由新鲜透析液样品发出的荧光在第二偏振面中的强度,所述第二偏振面不同于所述第一偏振面;确定由新鲜透析液样品发出的荧光的各向异性;以及基于由新鲜透析液样品发出的荧光的各向异性和强度这二者,来确定新鲜透析液样品中至少一种荧光团的浓度。

[0040] 在另一个优选的实施方案中,基于所检测出的水平强度减去所检测出的垂直强度的减法运算来确定样品中人白蛋白的浓度。

[0041] 具有权利要求15所述特征的装置也能实现上述内容。优选实施方案可得自从属权利要求。

[0042] 因此,用于监控患者的体外血液处理(优选用于监控患者的透析、血液透析、血液透析滤过、血液滤过和/或腹膜透析处理)的装置包括:照射光源,其利用线性偏振光对在透析处理中使用的液体样品进行照射;以及检测器,其用于检测由所述液体样品发出的荧光在第一偏振面以及与该第一偏振面不同的第二偏振面中的强度,其中具有分析单元,其用于确定由液体样品发出的荧光的各向异性,并且用于基于由液体样品发出的荧光的各向异性和强度来确定液体样品中至少一种荧光团的浓度。

[0043] 优选的是,在液体样品和用于检测荧光强度的检测器之间设有至少两个偏振器,这两个偏振器的偏振面之间呈一定的角度,其中在光路径中设有可移动的光闸(shutter)



以交替覆盖两个偏振器中的一者,从而交替地检测两个偏振面中的荧光强度。通过设置两个偏振器,提供了这样一种组件,其避免了光学部件的移动,由此能够可靠地测量。

[0044] 优选的是,在穿过液体样品的光源透射光的光路径中存在旋转光闸,使得能够通过一个检测器便能检测到透射光的强度以及至少两个不同的偏振面中的荧光强度。

[0045] 此外,在可供替代的方案中,在液体样品的相对的两侧布置了第一检测器和第二检测器,从而同时检测第一偏振面和第二偏振面的荧光,其中所述第一检测器连带有具有第一偏振面的偏振器,第二检测器连带有具有第二偏振面的偏振器,其中该第二偏振面不同于第一偏振面。

[0046] 优选的是,在与照射光共轴的方向上布置有第三检测器,并将液体样品放置到该检测器与照射光源之间以检测透射强度。

[0047] 所述装置优选被构造为实施上文描述的方法。

### 附图说明

[0048] 通过参照以下详细描述并结合随附的附图能够更容易地理解本发明,在所述附图中:

[0049] 图1示出了分子的偶极矩和该分子的跃迁偶极矩;

[0050] 图2示出了用于确定使用后的透析液中荧光团的各向异性的示意性实验布置;

[0051] 图3示出了不同分子的各向异性光谱的示意图,特别是人白蛋白和色氨酸的图;

[0052] 图4是用于进行所建议的方法的装置的示意图;

[0053] 图5是示出人白蛋白的浓度与所测得的总偏振荧光的强度之间的关系示意图;

[0054] 图6是示出具有不同分子质量的蛋白质的相关时间常数的示意图;

[0055] 图7为用于测量UV光中的各向异性的实验布置的示意图,其中测量了偏振面中的偏振光的强度;

[0056] 图8对应于图7的示意图,但使用了不同的偏振器从而测量了垂直面内的偏振光的强度;

[0057] 图9示出了用于测量UV各向异性的实验布置的另一种构造;以及

[0058] 图10示出了用于测量UV各向异性的实验布置的另外一种构造。

### 具体实施方式

[0059] 在下文中,将结合附图对本发明做详细解释。在这些图中,相同的部件用同一附图标记表示并省略对其的重复描述,从而避免赘述。

[0060] 本发明的目的是监控体外血液处理中某些分子的清除率,同时确保重要的分子(例如人白蛋白)未被过量去除。

[0061] 在下文中,基于透析处理来详细阐述该方法。但是,所述方法并不旨在仅限于透析处理,而是旨在用于所有其他体外血液处理,例如用于监控患者的透析、血液透析、血液透析滤过、血液滤过和/或腹膜透析处理。

[0062] 为了实现该目的,必须能够分别测量白蛋白的浓度以及所谓的中等分子(即,尺寸小于66kDa的蛋白质)的浓度。此外,在使用后的透析液中,也存在额外的具有荧光活性的小分子物质,例如硫酸吲哚酚、对甲酚和苯酚。

[0063] 不幸的是,对于特定照射波长,病理分析所关注的各荧光团的发射光谱广泛地重合并且也存在于相同的UV范围内。除了这些不便之处以外,前述分子的荧光光谱相对较宽,使得所测光谱的解卷积(deconvolution)难以进行、或者仅能以较大的测量误差进行。因此,基于普通的荧光光谱,不可能确定透析液中各物质的精确浓度或精确比例,因此不能对浓度进行可靠的定量测定。

[0064] 通过利用本发明建议的各向异性,该问题得以解决。与此相关的效果被称为图片选择(photo selection),根据图片选择,在利用线性偏振光激发样品之后,由样品发出的荧光显示出了所发出的荧光的各向异性。

[0065] 通常,当原子或分子电吸收光子时,电子跃迁至更高的原子或分子轨道。由于电子结构发生这种变化,产生了新的电荷空间分布,使得吸收了光子的原子或分子的电偶极矩通常会发生改变。

[0066] 跃迁偶极矩由电偶极矩定义,其与相应原子或分子的基态与激发态之间的跃迁相关。跃迁偶极矩的向量方向对应于跃迁的偏振面,其决定了分子将如何与给定偏振的电磁波相互作用。基于分子内电荷的分布,跃迁偶极矩大小的平方是相互作用的强度。

[0067] 图1通过激发能场向量 $p_{g \rightarrow a}$ 来激发分子,从而使相应的分子由基态的电偶极矩 $p_g$ 激发至升高态 $p_a$ 时的跃迁偶极矩 $p_{a \rightarrow g}$ 的简化图示。此外,其示出在分子通过跃迁偶极矩 $p_{a \rightarrow g}$ 从激发态松弛至基态之前,其通常会通过内部作用(称为内部转化,其通常是由于分子内的振动作用发生的)而变得松弛。由于内部松弛作用,跃迁偶极矩 $p_{a \rightarrow g}$ 的向量通常以角度 $\alpha$ 相对于激发向量 $p_{g \rightarrow a}$ 而发生改变。

[0068] 跃迁偶极矩是由各分子的结构确定的并且与分子一起移动,但相对于分子的相对取向(relative alignment)保持固定。

[0069] 如易于理解的那样,当给定偏振的电磁波(或者更确切地说它的场向量)的取向与跃迁偶极矩 $p_{a \rightarrow g}$ 共轴时,则吸收的可能性最高。因此,如果使用线性偏振光来激发透析液样品中的分子时,对于恰好共线要求的分子而言,通过线性偏振光来激发分子的可能性是最高的。这一过程称为图片选择,这是因为分子是在其偶然与照射光的偏振面之间呈特定空间关系时被激发的。

[0070] 此外,当通过发射光子的方式而从激发态跃迁至基态时(当然,也可能发生松弛而不发射光子的情况,例如发射声子),跃迁偶极矩 $p_{a \rightarrow g}$ 的取向决定了所发射的荧光的偏振。偶极发射(dipole emission)相对于偶极矩的轴而对称地传递,其中强度在与偶极轴垂直的方向上是最强的,其中其强度在平行于偶极轴的方向上消失。

[0071] 由此,所发射的荧光是偏振的且是各向异性的。

[0072] 图2示意性地示出了用于测量激发光和发射光的布置。通过光源L发出激发光并在第一偏振器中被偏振化,使得电场的向量垂直于激发和发射射线所在的平面。

[0073] 在检测器D的一侧设置有第二偏振器,第二偏振器能够旋转并位于仅能够使发射的荧光通过的位置。优选的是,激发光的方向和检测器D相对于样品的方向是彼此垂直的,从而避免激发光撞击(impinge)检测器。

[0074] 通过旋转第二偏振器,可以通过检测器D来检测强度 $I_{vv}$ (垂直强度)和强度 $I_{vh}$ (水平强度)。强度 $I_{vv}-I_{vh}$ 之差是被检测器D接收的光的极化度的一种度量。极化度P和各向异性A可以如下确定:

$$[0075] \quad P = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + G * I_{vh}} \quad (1)$$

$$[0076] \quad A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}} \quad (2)$$

[0077] 这里,  $I_{vh}$ 是在旋转第二偏振器使得仅水平偏振光可以通过时所检测到的荧光的强度。 $I_{vv}$ 是旋转发射偏振器使得仅垂直偏振光可以通过时所检测到的荧光的强度。 $G$ 是装置常数,设置该装置常数是为了补偿测量系统在水平面和垂直面中产生的潜在的灵敏度差异。 $G$ 是通过实验确定的,其可以输入系统的软件中作为常数。常数 $G$ 还可以通过以下方式在线测量:在使用水平偏振激发光时,测量以水平偏振通过偏振器的光的强度,并且在使用垂直偏振激发光时,测量体系中垂直偏振的强度。随后将装置常数确定为 $G = I_{hv} / I_{hh} \cdot I_{vv} + 2GI_{vh}$ 是当全部发射能以全角 $\Omega = 4\pi$ 而各向同性发射时获得的平均发射强度。

[0078] 从等式(1)和(2)可以看出,极化度 $P$ 和各向异性 $A$ 可以容易地彼此替换。

[0079] 各向异性的范围介于 $-0.2 \leq A_0 \leq 0.4$ 之间。最大值0.4对应于在不存在任何其他偏振影响时,吸收和发射跃迁偶极矩为共轴取向的情况。换言之,其对应于 $\alpha = 0^\circ$ 。但是,实际上,吸收偶极矩和发射偶极矩通常是非共轴的,而是彼此间形成一定的角度 $\alpha$ 。由此,所检测的各向异性为

$$[0080] \quad A_0 = \frac{3 * \cos^2 \alpha - 1}{5} \quad (3)$$

[0081] 对于 $\alpha = 0^\circ$ ,即吸收偶极矩和发射偶极矩为共轴排列, $A_0 = 0.4$ ,对于 $\alpha = 90^\circ$ ,该值 $A_0 = -0.2$ 。在所谓的魔角 $\alpha = 54.7^\circ$ 处,没有观察到各向异性。

[0082] 由于跃迁偶极矩的取向随着吸收波段而变化,由此,角度 $\alpha$ 以及随之的各向异性 $A_0$ 也随着激发波长 $\lambda_{exc}$ 变化,并且还随着激发波长 $\lambda_{em}$ 变化。各向异性的函数 $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ 对于每个荧光团都是不同的,其示意性地示出于图3中。

[0083] 特别是,在图3中,在上方的图中,示出了在激发波长 $\lambda_{exc} = 275\text{nm}$ 处的人白蛋白、牛白蛋白和纯白蛋白的各向异性光谱。可以清楚地看出,对于介于290nm和400nm之间的不同发射波长 $\lambda_{em}$ ,各向异性在0.2和0.1之间变化。

[0084] 在图3中下方的图中,示出了人白蛋白(66.5kDa)、氨基酸色氨酸(204Da)、这两种物质的混合物、以及硫酸吡啶酚的各向异性图谱。这里再次提到的是,可以清楚地看出,各向异性的函数 $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ 对于每个荧光团都是不同的。

[0085] 此外,各向异性函数 $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ 受到外部因素的影响,例如介质的温度和粘度以及各荧光团与其他介质的结合。这也可以对图3中下方的图进行分析而看出,其中色氨酸的各向异性函数在很大程度上不同于色氨酸与人白蛋白的组合的各向异性函数。

[0086] 对于使用后的透析液的分析,重要的考虑因素在于只有大分子示出了显著的各向异性,这是因为它们具有相对较大的旋转相关时间常数 $\theta$ ,这将在下文进一步讨论。使用后的透析液中的这些物质通常是蛋白质,其中白蛋白是这些物质的重要代表。在偏振强度 $I_{vv}$ 和 $I_{vh}$ 下,较小分子的荧光团通常仅提供以各向同性分布的强度。因此,它们的特定各向异性为 $A_j = 0$ 。由此,给予这一发现,可以基于总各向异性 $A_{total}$ 来确定白蛋白的强度比例,条件是预期存在于透析液中的其他荧光团仅提供各向同性影响。

[0087] 图4示意性示出了能够与本发明方法组合使用的测量装置。具体而言,设置有光源

L,其通过透镜校准和聚焦,并且激发光通过偏振器 $P_{exc}$ 而偏振化。经过偏振化、校准和聚焦的激发光随后被导入比色皿C并通过光电二极管D测量,从而对光源L的变化的强度进行调整。

[0088] 由比色皿C中的荧光团发出的荧光以这样的角度被激发,使得来自光源L的发射光不会干扰荧光。荧光发射通过第二偏振器 $P_{em}$ ,可对第二偏振器 $P_{em}$ 加以调整。随后偏振化的荧光撞击衍射光栅G并被反射至CCD传感器,使得在分析单元A中对荧光的总光谱进行分析。所得结果可以在显示器中示出。

[0089] 由于透析器的用过的透析液下游侧包含多于一种的荧光团,因此其吸收光谱和发射光谱被认为会发生叠加。因此,求和光谱的总各向异性 $A_{total}$ 为:

$$[0090] \quad A_{total} = \sum_i f_i * A_i \quad (4)$$

$$[0091] \quad \text{其中 } f_i = \frac{S_i}{S_{total}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,total} + 2 * G * I_{vh,total}} \quad (5)$$

[0092]  $A_{total}$ 是求和光谱的各向异性, $A_i$ 是第i个荧光团的各向异性, $f_i$ 是第i个荧光团相对于总强度的强度分数, $S_i$ 是第i个荧光团的物理照射的总强度, $S_{total}$ 是所有荧光团的总物理照射强度, $I_{vh,i}$ 是第i个荧光团的所测量的水平荧光强度, $I_{vv,i}$ 是第i个荧光团的所测量的垂直荧光强度,i是所有荧光团的指数。

[0093] 如果荧光团是充分稀释的,则荧光团的物理照射 $S_i$ 的总物理强度与其浓度 $C_i$ 呈比例。i荧光团的各向异性 $A_i$ 被认为是已知的常数。必须基于求和光谱来确定强度分数 $f_i$ 。

[0094] 如上所述,只有较大的分子对各向异性提供显著影响。因此,即使白蛋白的荧光分数不能基于求和光谱来直接确定,也能够基于上述等式(4)来计算白蛋白的强度分数 $f_{alb}$ :

$$[0095] \quad f_{alb} = \frac{A_{total}}{A_{alb}} \quad (6)$$

[0096] 在此基础上,基于等式(5)给出了白蛋白的总物理照射强度:

$$[0097] \quad S_{alb} = f_{alb} * S_{ges} = \frac{A_{total} * S_{total}}{A_{alb}} \quad (7)$$

[0098] 在此基础上,可如下确定白蛋白的浓度:

$$[0099] \quad C_{alb} = \frac{1}{5} * \frac{g(\lambda)}{I_{exc,0}} * S_{alb} \quad (8)$$

$$[0100] \quad \text{其中 } g(\lambda) = \frac{10 * \epsilon * \lambda_{em}^4}{\pi^2 * c * \Phi_e * \alpha(\lambda_{exc}) * L * p^2} \quad (9)$$

[0101] 其中 $I_{exc,0}$ 是偏振照射光的强度, $\epsilon$ 是电场常数, $\lambda$ 是波长对(照射波长 $\lambda_{exc}$ ,发射波长 $\lambda_{em}$ ), $c$ 是光速, $\Phi_e$ 是量子效率, $\alpha(\lambda_{exc})$ 是在照射波长 $\lambda_{exc}$ 下的吸收系数,L是通过比色皿的路径,p是被激发的荧光团的电偶极矩。

[0102] 激发强度 $I_{exc,0}$ 可以随时间变化,并优选在线测量并校正。函数 $g(\lambda)$ 还可以看做标定函数,其是基于纯白蛋白或其他参比溶液而通过实验确定的。例如,函数 $g(\lambda)$ 可以在相应设备的生产商那里确定。

[0103] 另一方面,还可以确定水光谱的史托克谱线(Stokes lines)的强度 $I_{H2O,0}$ ,从而在

装置的运行中测量实际强度 $I_{H20}$ 并调整标定函数 $g(\lambda)$ 至装置的实际状态:

$$[0104] \quad g(\lambda) = g_0(\lambda) * I_{H20} / I_{H20,0}$$

[0105] 在这一方面,可以使用具有相对较大机械耐受性的成本有效的比色皿来确定荧光团的浓度。

[0106] 如果偏振化的照射组分 $S_x$ 和 $S_z$ 与其他荧光团的各向同性照射叠加,特别是与小分子的各向同性照射叠加(如上所讨论的那样,如果小分子的各向同性照射对所测量的照射强度的各向异性有影响的话,那么这种影响也是有限的),那么各向同性组分对偏振化的照射组分 $S_x$ 和 $S_z$ 提供相同的偏移(offset)  $S_{offset}$

$$[0107] \quad S_{x,total} = S_{x,Alb} + S_{offset} \quad (10a)$$

$$[0108] \quad S_{z,total} = S_{z,Alb} + S_{offset} \quad (10b)$$

[0109] 因此,可以通过简单的减法运算即可确定白蛋白的照射强度(假设能够示出显著各向异性的物质仅为人白蛋白)

$$[0110] \quad \Delta S_{Alb} = S_{z,Alb} - S_{x,Alb} = S_{z,total} - S_{x,total} = I_{vv,total} - G * I_{vh,total} \quad (11)$$

$$[0111] \quad \Delta S_{total} = 3 * \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb} - \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb} = 2 * \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb}$$

$$[0112] \quad C_{Alb} = \frac{1}{2} * g(\lambda) * \frac{I_{vv,total} - G * I_{vh,total}}{I_{exc,0}} \quad (12)$$

[0113] 其中 $I_{vh,i}$ 是所检测到的所有水平荧光强度, $I_{vv,i}$ 是所检测到的所有垂直荧光强度。

[0114] 图5示意性地示出了对于不同的人血清白蛋白(HAS)和游离色氨酸的混合物,HAS的浓度与所测量的总偏振化荧光照射强度之间的关系。

[0115] 不同的荧光团在分子大小方面是不同的。在这一方面,应关注以下考虑因素:

[0116] 激发光子的吸收仅需约 $10^{-15}$ 秒。通过分子振动的松弛,换言之,通过内部转换,激发态 $S_1$ 非常迅速地松弛至可能的能量最低水平,通常在 $10^{-12}$ 秒内完成,这是因为荧光的寿命在 $\tau = 10^{-8}$ 的范围内,因此荧光的寿命是相当长的。

[0117] 通过发射光子或通过辐射跃迁,从而实现激发电子从该能量最低振动水平松弛至基态 $S_0$ 。这两个过程都能够使激发态 $S_1$ 的能级降低。因此,如果通过短激发脉冲来激发样品,那么荧光强度 $I$ 示出以下衰减函数:

$$[0118] \quad I = I_0 * e^{-t/\tau} \quad (13)$$

[0119] 其中 $\tau$ 是激发态的寿命。

[0120] 对于各向异性 $A$ ,另一种机制加强了强度的去偏振(depolarization of the intensity),这是因为分子围绕分子的轴进行旋转,分子的轴与发射方向有关。在激发脉冲之后,所有分子立即被同步化,但在该脉冲之后,在特定的时间段内所有分子都发生扩散(diffuse),该时间段被称为旋转相关时间 $\theta$ 。对于自由旋转的球型分子,给出了Perrin关系式:

$$[0121] \quad A = A_0 * e^{-t/\theta} \quad (14)$$

[0122] 其中 $\theta$ 是旋转相关时间,其是特征时间常数,其描述了这样的时间段:在该时间段内通过分子旋转,跃迁偶极矩的轴发生扩散取向; $A_0$ 是在任何偏振效果发生之前在 $t=0$ 时的各向异性。

[0123] 在脉冲激发下,可以观察到根据等式(14)的以时间分辨方式进行的各向异性衰减。基于此,可确定旋转相关时间 $\theta$ —或通过多于一种荧光信号的叠加,各荧光团的旋转相关时间 $\theta_i$ ,其中每种荧光团的旋转相关时间 $\theta$ 都是不同的。因此,所确定的旋转相关时间 $\theta$ 可用于指示各荧光团。

[0124] 当对样品进行持续照射时,可以确定以下各向异性的值 $A_m$ :

$$\begin{aligned}
 [0125] \quad & \int_0^{\infty} A_m * e^{-t/\tau} * dt = \int_0^{\infty} A_0 * e^{-t/\theta} * e^{-t/\tau} * dt \\
 [0126] \quad & A_m * \int_0^{\infty} e^{-t/\tau} * dt = A_0 * \int_0^{\infty} e^{-t*(1/\theta+1/\tau)} dt \\
 [0127] \quad & A_m * \tau = A_0 * \frac{1}{\frac{1}{\theta} + \frac{1}{\tau}} \\
 [0128] \quad & \frac{A_m}{A_0} = \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \quad (15)
 \end{aligned}$$

[0129] 对于球形分子的相关时间常数 $\theta$ 的计算,通常使用以下关系式:

$$\begin{aligned}
 [0130] \quad & \theta = \frac{\eta * M}{R * T} * (\bar{v} + h) \\
 & (16)
 \end{aligned}$$

[0131] 其中 $\eta$ 表示溶剂在温度 $T$ 时的粘度[Pa\*s], $M$ 是分子的摩尔质量[g/mol], $R$ 是常规气体常数[8,314J/mol/K], $T$ 是温度[K], $\bar{v}$ 是分子的比容[ml/g],例如蛋白质:0.73ml/g; $h$ 是水合度[ml/g],(例如对于蛋白质为0.32ml/g)。

[0132] 对于处于粘度较低的溶剂中的较小的分子(例如在水中或在血浆中),各向异性非常迅速地衰减,其中对于较大的分子(例如蛋白质),各向异性能够保持相对长的时间,并且甚至可以比荧光寿命 $\tau$ 更长。

[0133] 图6示出了具有不同分子质量的不同蛋白质的测量,例如:白蛋白(66kDa);较轻的蛋白质,例如 $\beta_2m$ (11.7kDa);甚至更小的分子,例如游离的色氨酸(<0.5kDa),它们可以通过相关时间常数 $\theta$ 加以区分。

[0134] 根据等式(15),平均各向异性 $A_m$ 随着相关时间常数 $\theta$ 而变化,由此可以从等式(16)中得出,平均各向异性 $A_m$ 随着分子质量 $M$ 而变化。

[0135] 通过施加较低的温度(例如通过冷却样品)或者通过升高粘度(例如通过形成凝胶或通过冷冻),可以延长各向异性的寿命。

[0136] 从统计学上来看,分子轴的取向通常在空间中是均匀分布的,通过施加外部电场或外部磁场从作用于分子的电偶极矩和磁偶极矩,由此可使分子轴发生取向。通过这种方式,可使最佳取向偏振面中的激发增加,从而可提高该过程的信号强度。此外,分子的自由旋转可能受阻,从而可延长各向异性的寿命。

[0137] 基于此,可以清楚地区分分子。

[0138] 例如,对于游离的色氨酸,其分子具有 $\tau=3ns$ 的荧光寿命和 $\theta=50$ 皮秒的相关时间常数,使得 $A_m/A_0=1.6\%$ 。但是,对于结合至人白蛋白的色氨酸分子,荧光寿命为 $\tau=8ns$ ,相

关时间常数 $\theta=41\text{ns}$ ,使得 $A_m/A_0=83.7\%$ 。

[0139] 在使用过的透析液中,各向异性光谱通常包括不同中等分子物质和甚至其他荧光团的强度分数的叠加。基于这样测量的总光谱,需要计算各物质的各向异性比例从而确定各物质各自的浓度。

[0140] 通过以下方法,所测量的光谱 $f(\lambda)$ 视为N种不同荧光团的光谱的线性对当(linear opposition):

$$[0141] \quad f(\lambda) = \sum_{i=1}^N c_i s_i(\lambda)$$

[0142] 这里, $c_i$ 是第i个荧光团的浓度, $s_i(\lambda)$ 是灵敏度。

[0143] 如果光谱是在M个不同波长对 $\lambda_i$  ( $\lambda_{i,\text{exc}}, \lambda_{i,\text{em}}$ ) 下测量的,那么便获得了m个等式系统,其中这些等式系统中含有n个未知数:

$$[0144] \quad \begin{pmatrix} f(\lambda_1) \\ f(\lambda_2) \\ \vdots \\ f(\lambda_M) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} s_1(\lambda_1) & s_2(\lambda_1) & \cdots & s_N(\lambda_1) \\ s_1(\lambda_2) & s_2(\lambda_2) & \cdots & s_N(\lambda_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_1(\lambda_M) & s_2(\lambda_M) & \cdots & s_N(\lambda_M) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_N \end{pmatrix}$$

[0145] 最为实际的做法是,通过最小二乘拟合来解开上述等式系统:

$$[0146] \quad S = \sum_{i=1}^M \left( f(\lambda_i) - \sum_{j=1}^N s_j(\lambda_i) c_j \right)^2$$

[0147] 因此,浓度 $c_j$ 是线性等式系统中的系数,其中第k个浓度 $c_k$ 可以通过以下行列式 $\det()$ 来计算:

$$[0148] \quad c_k = \frac{\det(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_{k-1}, \bar{y}, \bar{x}_{k+1}, \dots, \bar{x}_N)}{\det(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_N)}$$

[0149] 图7和图8示出了用于进行所述方法的测量装置的布置的例子。设有UV照射光源1,其用于提供激发光。UV光源1可以设置为窄发射LED、激光或宽发射光源(例如Hg灯、Xe灯或氙灯,其随后与单色器或诸如Fabry-Perrot滤波器之类的任何其他光波段通道(optical band pass)连接。

[0150] 由光源1发出的激发光被聚焦镜2聚焦。聚焦镜2起到使UV光源1的光聚焦和/或校准的作用。随后,经聚焦和/或校准的光被引导通过偏振器3,最优选的是,偏振器3是固定的偏振器。固定的偏振器旨在将光以垂直的方向偏振( $I_v$ )。随后经过垂直偏振的光被引导通过比色皿4,其中透析液以使用过的透析液的形式在比色皿4中流动。

[0151] 可以在制造商处通过将偏振器手动旋转 $90^\circ$ 从而可靠地获得垂直偏振的强度和水平偏振的强度,由此来确定装置常数 $G(\lambda)$ 。

[0152] 在比色皿4(其中使用过的透析液在该比色皿4中流动)中,经偏振的激发光照射荧光团以使其激发。由激发的荧光团发出的荧光随后被引导通过第一偏振器5,并随后借助发射聚焦镜6照射到衍射光栅上并到达检测器7,从而确定实际的荧光光谱。

[0153] 在图7中偏振器5布置为水平偏振器。在图8中,第二偏振器5' 布置为垂直偏振器。

[0154] 通过与图8对照可以看出,设置有可转动的光闸区段(shutter segment)8,其遮蔽第一偏振器5或第二偏振器5' 中的一者,从而能够通过可转动的光闸区段8,从而在水平偏

振(如图7)和垂直偏振(如图8)之间对检测器7所检测的荧光进行选择。

[0155] 此外,在光的发射路径中,第一水平偏振器5和第二垂直偏振器5' 固定安装在装置中,使得光学部件不会发生错误取向(misaligned)并且能够可靠地确定装置常数G。所示出的固定布置的偏振器的优点在于在操作中不必移动光学组件。因此,不存在机械再现性的耐受性的问题。

[0156] 图9示出了相似的安排,其中使用了另一种形式为旋转光圈的可转动区段,其位于比色皿透射侧的光路径中,使得能够利用同一检测器7来测量透射通过比色皿的激发光作为两种不同偏振的荧光。特别是,可以利用这种布置并利用一个检测器7来测量偏振强度 $I_{vv}$ 、偏振强度 $I_{vh}$ 、透射强度 $I_t$ 以及切断检测器(shut-off detector)的背景强度 $I_d$ 。

[0157] 在图10中示出了另一种布置方式,根据这种布置方式,可以同时测量两种不同的偏振强度和透射强度。特别是,其具有两种偏振器5和5' 的T型布置方式,其与用于检测偏振荧光强度 $I_{vv}$ 和 $I_{vh}$ 的检测器以及用于检测透射强度 $I_t$ 的检测器9联用。

[0158] 垂直偏振器5设置在比色皿4的一侧,而水平偏振器5设置在比色皿4的相对侧,使得光能够在一侧耦合或者在另一侧耦合,由此形成T型布置。这样的优点在于用于使从比色皿4发出的荧光耦合的表面能够被扩大,从而提高灵敏度。此外,在上述布置方式在,光通过彼此呈 $90^\circ$ 的偏振器从而在比色皿的两侧被耦合,由此可以同时两种强度进行分析。

[0159] 为了使从比色皿4中发出的光耦合,可以设置特定的窗口40从而避免反射。



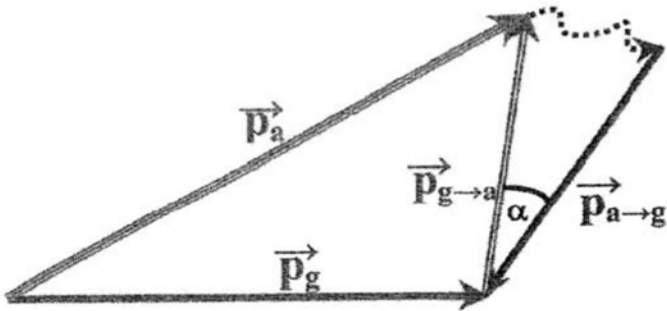


图1

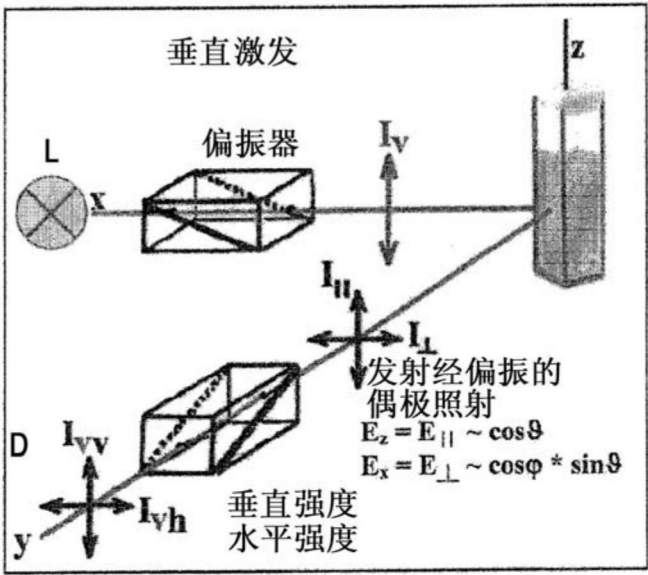


图2

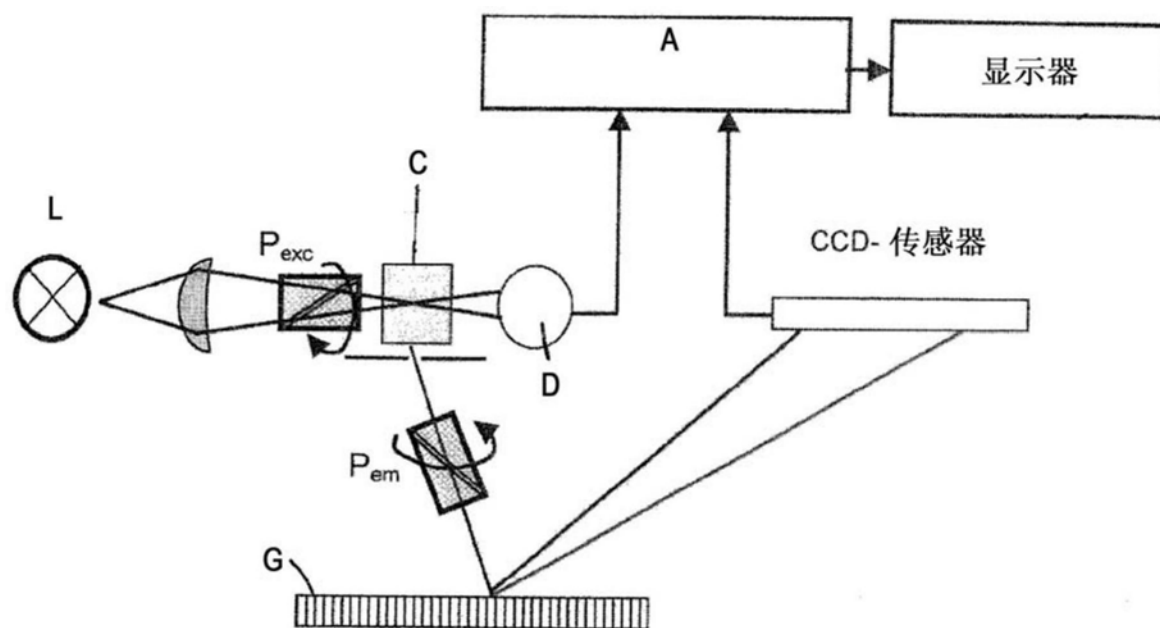


图4

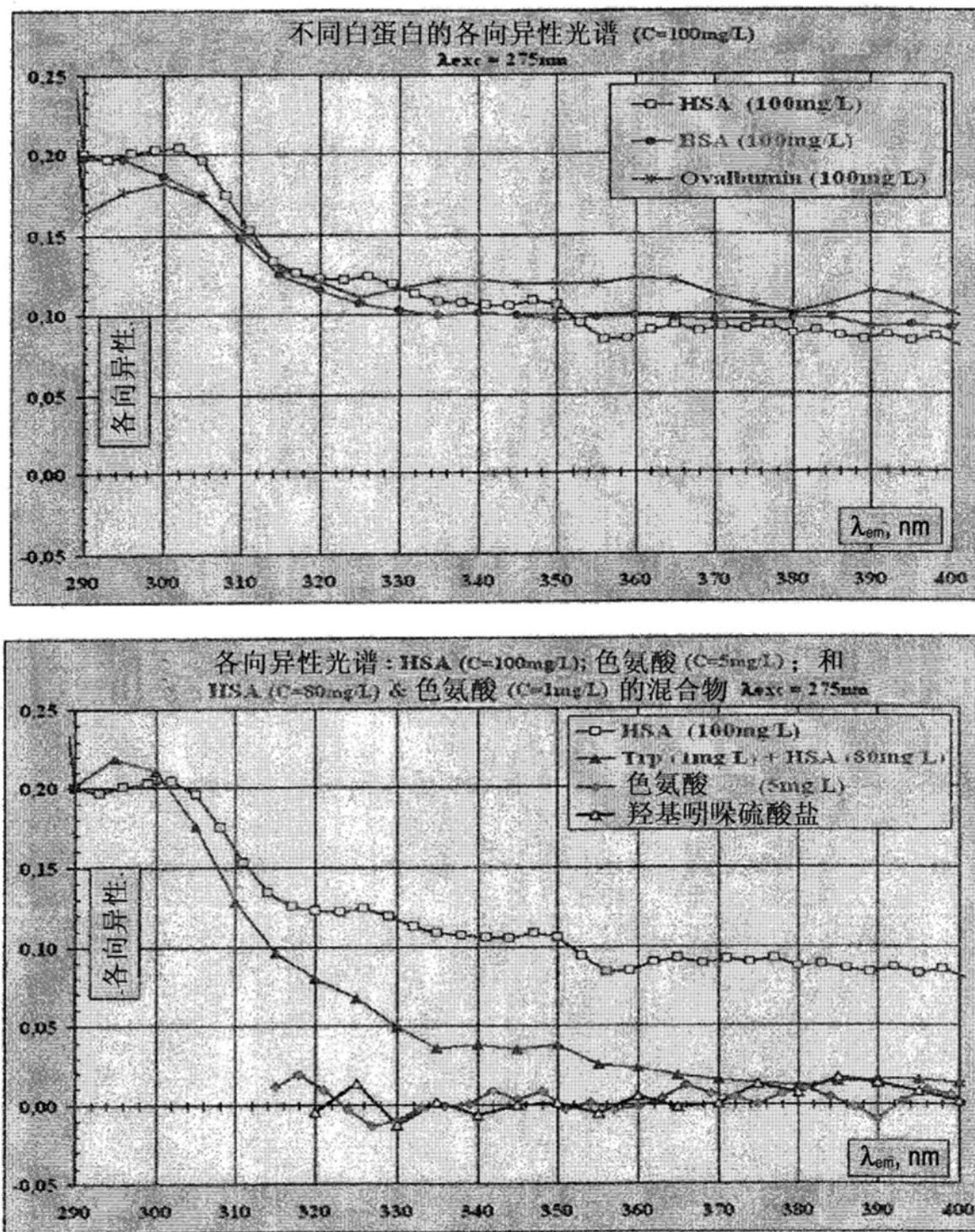


图3

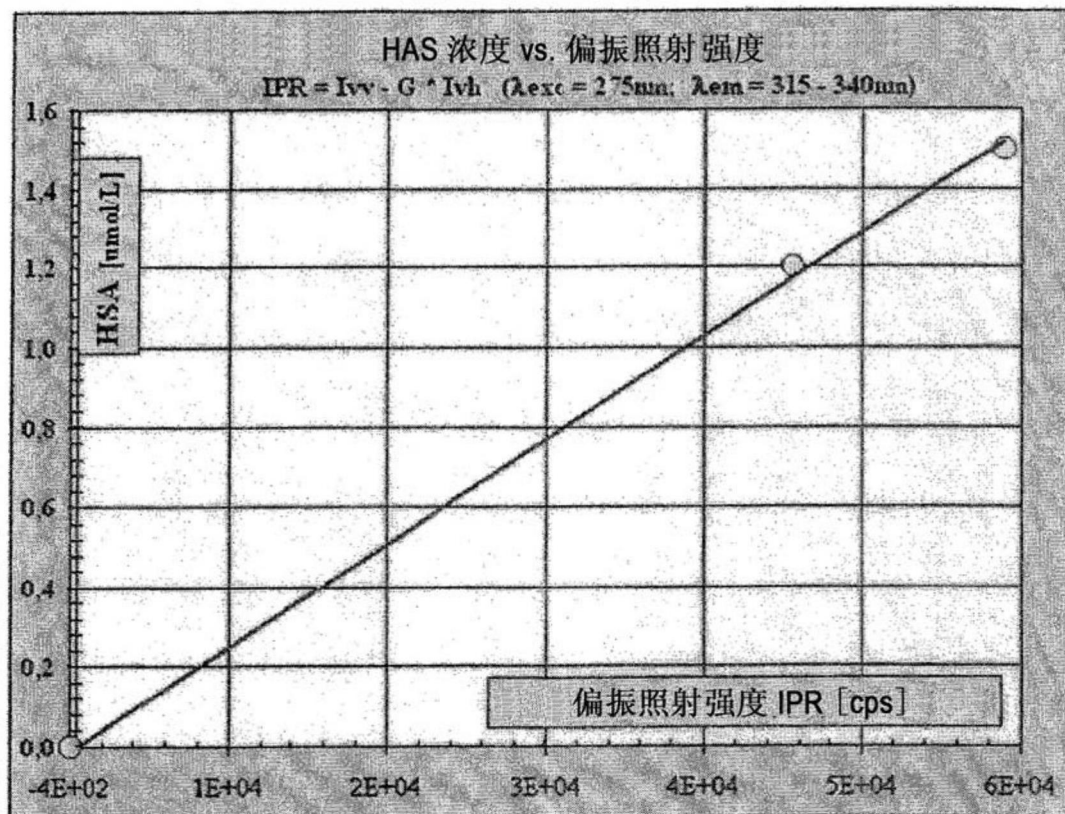
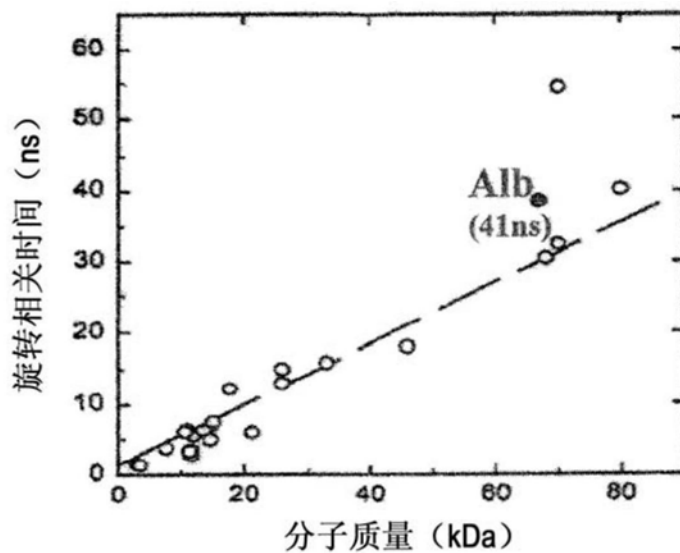


图5



参考: Joseph R. Lakowicz, Topics in the Fluorescence Spectroscopy, 第6卷, Protein Fluorescence, ISBN: 0-306-46451-9, 2002 Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow

图6

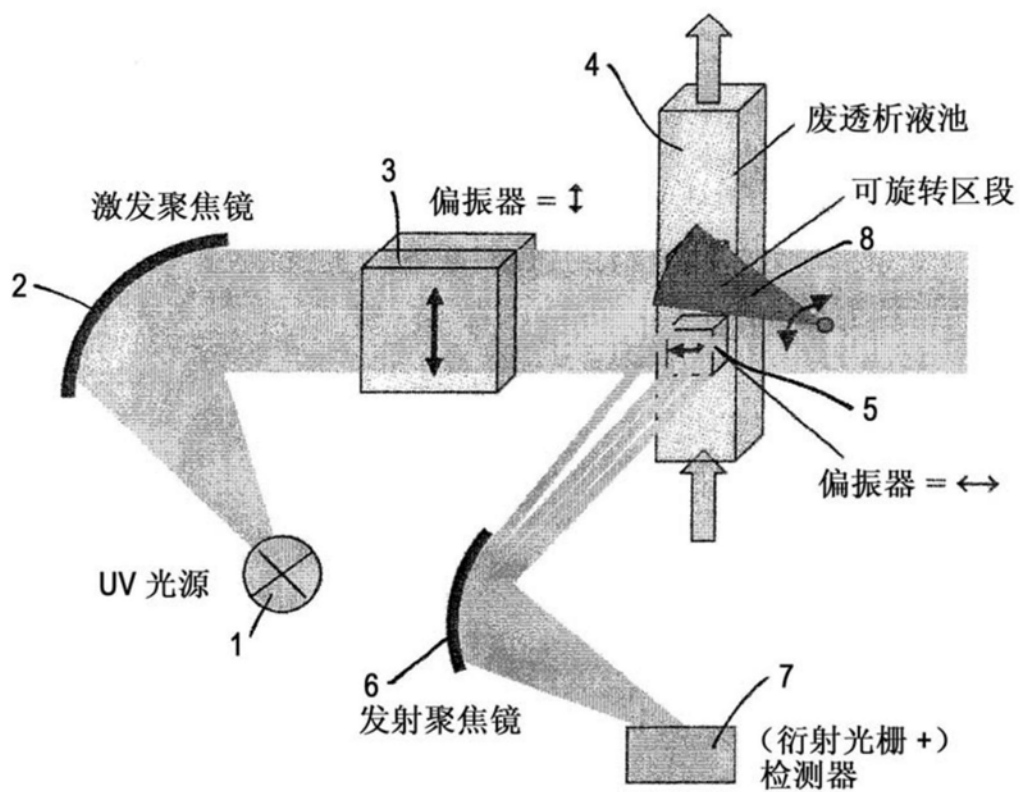


图7

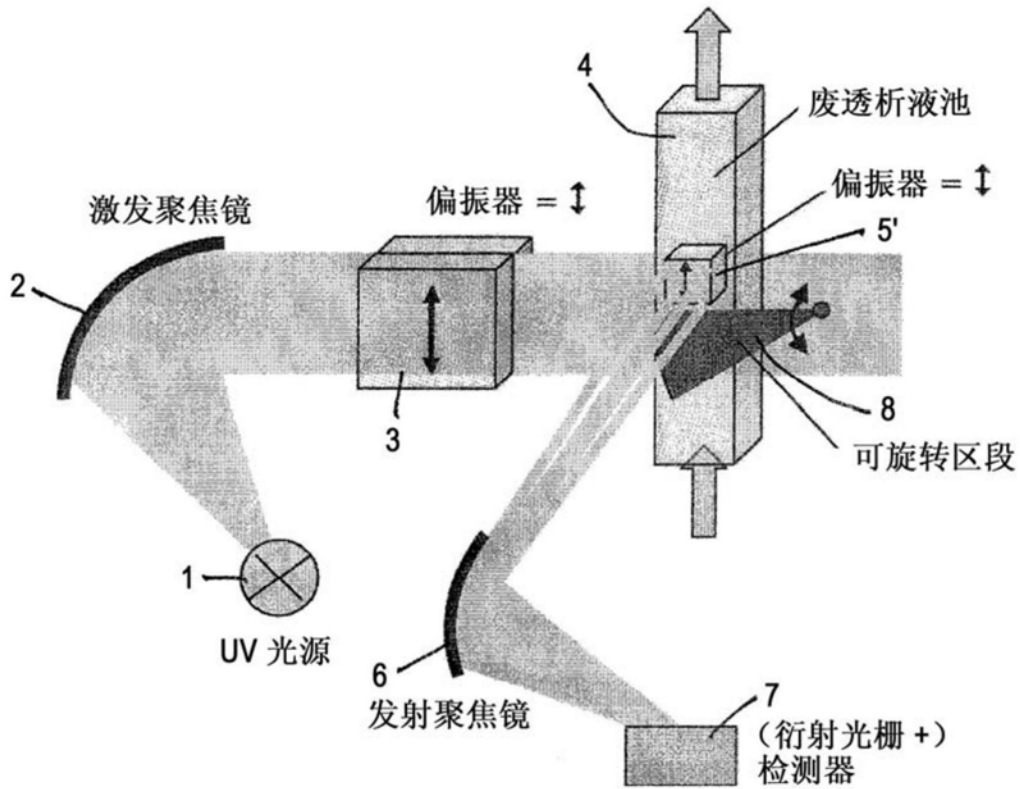


图8

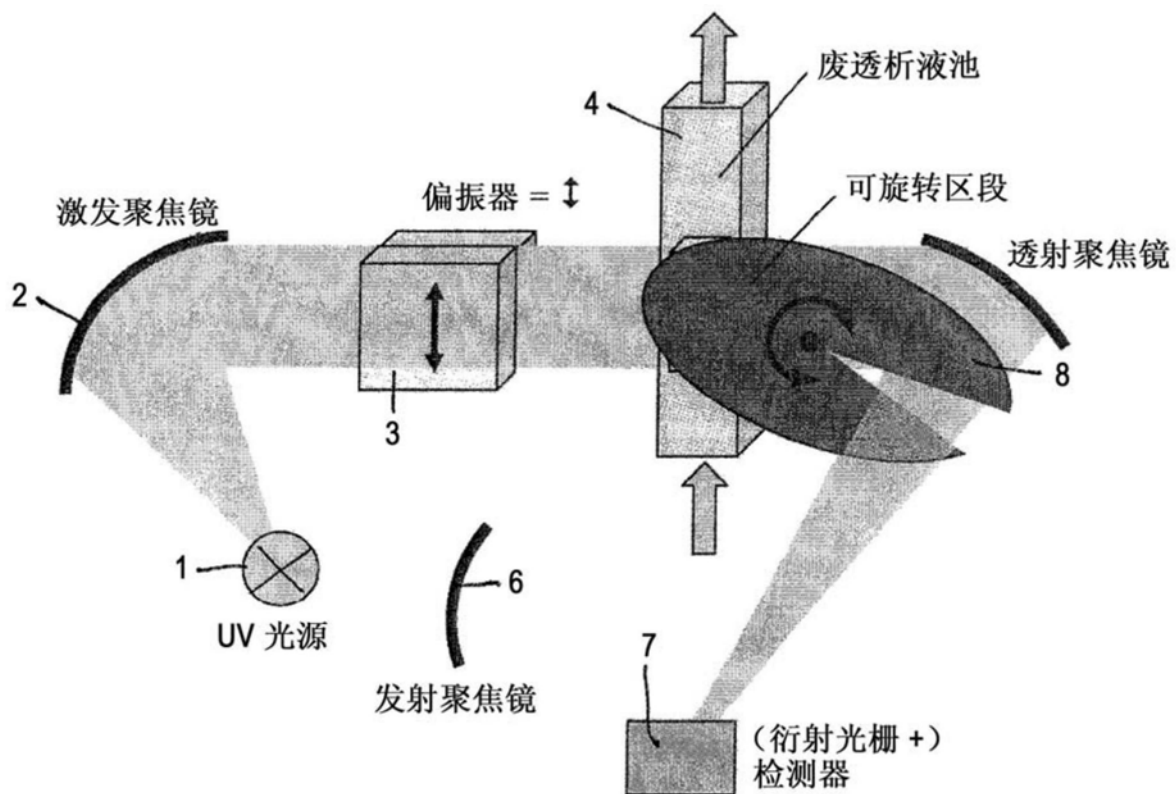


图9

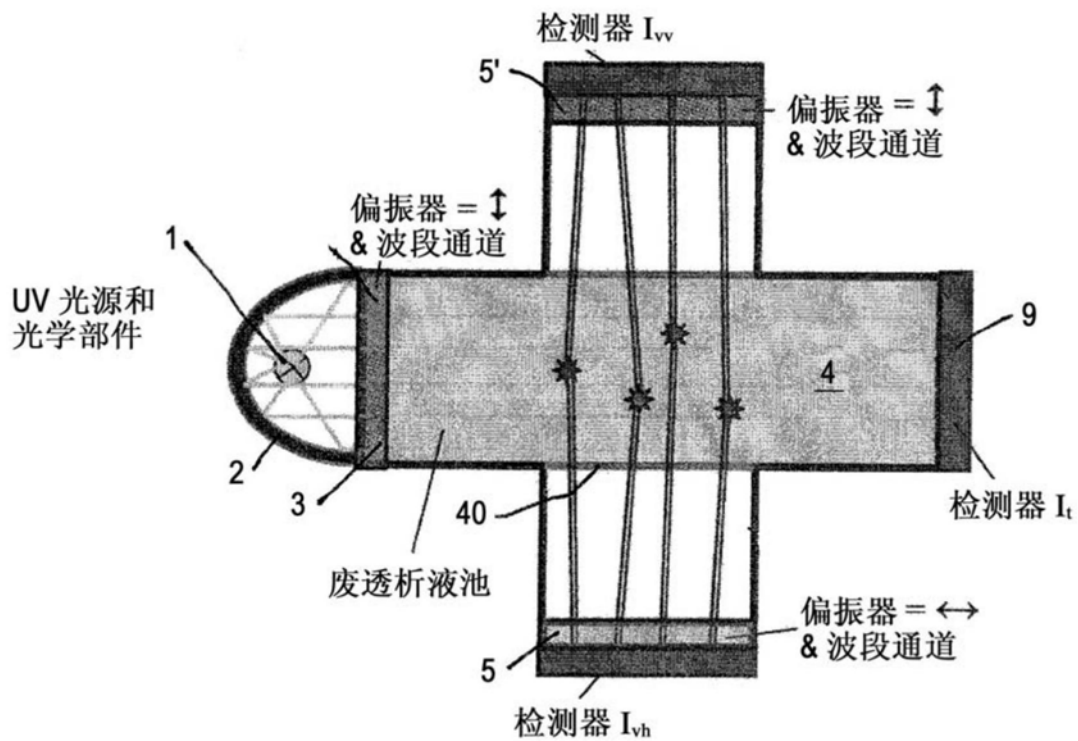


图10