



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

81448

C (15) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 10 1990

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

G 01N 15/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	845103
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	21.12.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	21.12.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	28.06.85
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.06.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
27.12.83 DE 3347162 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Metzmann, Erwin, Höhenweg 44, Marburg, BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Fotometrinen menetelmä pitoisuuden määrittystä varten reaktioissa, jotka etenevät muodostaen tai kuluttaen sirontakeskuksia
Fotometriskt förfarande för bestämmande av koncentrationen i reaktioner, vilka förlöper under bildande eller förbrukande av spridningscentraler

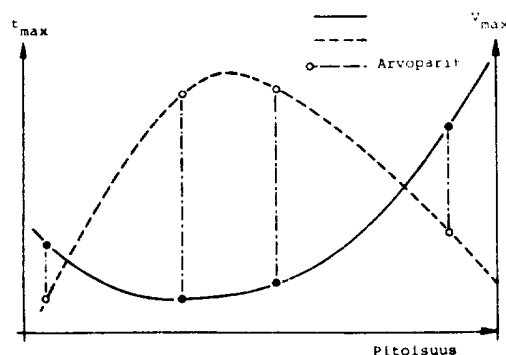
(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 4157871 (G 01N 21/00), US A 4204837 (G 01N 31/00), US A 4268171 (G 01N 21/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu fotometriseen menetelmään reaktantin pitoisuuden määrittystä varten reaktiossa, joka etenee muodostaen tai kuluttaen sirontakeskuksia siirtymisen mielessä Rayleigh-sironnasta Mie-sirontaan, jolloin mitataan suurin reaktionopeus ($V_{\max}$) ja aika reaktion alusta suurimman reaktionopeuden ($t_{\max}$) esiintymiseen.

Pitoisuuden yksikäsitteistä määrittystä varten määritetään kokeellisesti funktionaalinen riippuvuus pitoisuuden, $V_{\max}$ -arvon ja $t_{\max}$ -arvon välillä standardivalmisteen avulla, mitataan näytteen $V_{\max}$ - ja $t_{\max}$ -arvot ja standardivalmisteen avulla määritettyä riippuvuutta reaktantin pitoisuuden ja $V_{\max}$ -arvon sekä $t_{\max}$ -arvon välillä käyttäen määritetään reaktantin pitoisuus.



Uppfinningen avser ett förfarande för fotometrisk bestämning av koncentrationen hos en reaktant i en reaktion, vilken förlöper under bildande eller förbrukande av spridningscentra för åstdkommande av en övergång från Rayleigh- till Mie-spridning, varvid den maximala reaktionshastigheten ($V_{\max}$) och tiden från inledandet av reaktionen till uppträädande av den maximala reaktionshastigheten ($t_{\max}$) bestäms. För entydig bestämning av koncentrationen bestäms experimentellt funktionella sammanhanget mellan koncentrationen, $V_{\max}$ och $t_{\max}$ empiriskt medelst ett standardpreparat, $V_{\max}$ och $t_{\max}$ mäts i provet och koncentrationen hos reaktanten bestäms medelst det från standardpreparatet erhållna förhållandet mellan reaktantkoncentrationen, $V_{\max}$ och $t_{\max}$.

Fotometrinen menetelmä pitoisuuden määrittystä varten reaktioissa, jotka etenevät muodostaen tai kuluttaen sirontakeskuksia

5 Keksintö kohdistuu menetelmään yhden reaktantin pitoisuuden fotometrasta määrittystä varten reaktiossa, joka etenee muodostaen tai kuluttaen sirontakeskuksia siirtymän aikaansaamiseksi Rayleigh-sironnasta Miesirontaan, jolloin mitataan suurin reaktionopeus $V_{\max}$ ja aika
10 $t_{\max}$ reaktion alusta suurimman reaktionopeuden esiintymiseen, pitoisuuden yksikäsitteistä määrittystä varten määrätään empiirisesti funktionaalinen riippuvuus pitoisuuden, $V_{\max}$ -arvon ja $t_{\max}$ -arvon välillä standardivalmisteen avulla, sekä mitataan näytteen $V_{\max}$ - ja $t_{\max}$ -arvot.

15 Valon sirontailmiöitä osasilla, jotka ovat homogeenisessa väliaineessa, käytetään sekä sironneen valon voimakkuuden mittauksen (nefelometria) että myös väliaineeseen saapuneen valonsäteen voimakkuuden häviön mittauksen (samauden mittaus) avulla pitoisuuden määrittämiseen.

20 Monet kemialliset reaktiot johtavat useammassa vaiheessa molekyylikasaumiin tai makromolekyyliihin, joiden valon sirontakäyttäytyminen poikkeaa erittäin paljon lähtöaineiden suhteen ja joiden pitoisuudet voidaan määrätä tämän ominaisuuden perusteella.

25 Esimerkiksi ylitettäessä liukoisuustulo kerääntyvät erittäin monet ionit kiteiksi, jotka esiintyvät ensin samentumanaja lopuksi kasvavat niin suuriksi, että ne eroittuvat saostumalla nestemäisestä faasista.

30 Toinen esimerkki on immunokemiallinen reaktio liukoisen antigeenin ja kaksiarvoisen vasta-aineen välillä, mikä voi muodostaa suuria ja valoa voimakkaasti hajoittavia molekyylikasaumia.

35 Näiden reaktioiden ajallinen kulku vastaa erittäin usein 1. kertaluokan peräkkäisten reaktioiden yleistä kiineettistä kulkua, tämä tarkoittaa, että pitoisuuskäyrässä

lopputuotteen muodostumiselle esiintyy käännepeiste ja siten suurin reaktionopeus esiintyy vasta reaktion kuluessa. Esimerkkinä immunokemiallisesta reaktiosta on tämä kulku esitetty kuviossa 1 kahdelle antigeenipitoisuudelle.

5 Kuvion 1 signaali/aika-käyristä voidaan pitoisuudesta riippuva mittasignaali saada eri tavoin (taulukko 1).

10 Taulukko 1 Ajalliset reunaehdot määrittäessä pitoisuudesta riippuvia mittasingaanelja (S = signaali, t = aika).

	<u>Nimi</u>	<u>Periaate</u>
15	1) Päätepeiste- menetelmä	Mittasignaali määrätään niin myöhäisenä ajankohtana, että se kokemuksen mukaan ei enää muutu, mutta saostumaa ei vielä esiinny.
20	2) Kineettinen menetelmä "fixed-time Kinetik"	Varsinainen mittasignaali on kahden signaalin erotus, jotka määrätään eri mutta kiinteästi etukäteen asetettuina ajankohtina
25	3) Kineettinen menetelmä "rate eter- mination" "peak rate method"	Määrätään suurin reaktionopeus, so. signaalin suurin muutos aikayksikössä: a) mittaamalla ΔS riittävän lyhyin aikavälein ja määräämällä suurin osamäärä $\frac{\Delta S}{\Delta t}$; b) muodosta alla elektronisesti differentiaali $\frac{\Delta S}{\Delta t}$ ja määräämällä maksimiarvo; c) muodostamalla tangentti signaali/aika-käyrälle ja määräämällä suurin kulmakerroin.

30

Suuri määrä analyyttejä voidaan nykyisin tutkia kvantitatiivisesti taulukossa 1 esitettyjen menetelmien mukaan suoraa tai epäsuoraa valonsirontamittausta käyttäen.

35

Jos tarkastellaan sopivan mittasignaalin (taulukko

1) riippuvuutta yhden reaktioon osaanottavan aineosan pitoisuudesta, esimerkiksi antigeenin pitoisuudesta ja toista aineosaa reaktiossa lisätään vakiopitoisuudella, voidaan havaita kuviossa 2 esitetty riippuvuus. Se yllättävä tosiasia, että samaa mittasignaalia voidaan käyttää analyytin sekä pienen että suuren pitoisuuden suhteen, johtaa kaksikäsitteisyyteen signaali/pitoisuusyhtälössä, mikä ammattimiehille on tunnettu antigeeniyliääräilmiönä tai heidelbergerkäyränä.

Tämä kaksikäsitteisyys voidaan periaatteessa havaita aina siellä, missä erilaisen stökiometrian mukaiset kompleksit ovat mahdollisia ensimmäisen tai toisen reaktioon osallistuvan aineosan ylimäärän mukaan ja nämä kompleksit eivät eroa signaaliominaisuuksiensa, esimerkiksi valonsironnan suhteen.

$\text{Mon}_x \text{CoMon}_{x+m}$	ja	$\text{Mon}_{x+m} \text{COMon}_x$	jolloin Mon = monomeeri,
			CoMon = komonomeeri,
$\text{Ag}_2 \text{Ak}$	ja	AgAk_2	jolloin Ag = antigeeni,
			Ak homologinen vasta-aine;
$\text{Lec}_2 \text{GP}$	ja	Lec GP_2	jolloin Lec = lektiini,
			GP = glykoproteiini;
$(\text{Ag}_x \text{Cl}_{x+1})^-$	ja	$(\text{Ag}_{x+1} \text{Cl}_x)^+$	jolloin Ag = hopeaioni,
			Cl = kloridi-ioni.

Jos näitä reaktioita suoritetaan pitoisuusmäärittämissä varten, määritellään ja optimoidaan menetelmä määrättyä ylimäärätilannetta varten. Käytännössä johtaa tämä vaikeuksiin siellä, missä analyytti voi olla erittäin suuressa pitoisuusalueessa eikä yhden reaktioon osallistuvan aineen pitoisuusylimäärää voida varmistaa.

Tämä tilanne on erikoisen merkittävä immunoglobuliinin immunokemiallisessa määrittämisessä, jolloin pitoisuus voi vaihdella tekijän 1000 mukaan. Testiolosuhteet ja taloudellisesti optimaalinen vasta-ainepitoisuus normaalin

ja subnormaalin pitoisuuden määrittämiseksi eivät salli tekijällä 1000 kasvanutta pitoisuutta. Seuraava esitys tarkastelee siten vain immunokemiallisia reaktioita, vaikka menetelmää voidaan soveltaa kaikkiin reaktioihin, joissa esiintyy edellä mainittuja ominaisuuksia ja joiden käyttäytyminen on kineettisesti analogista.

Immuunikemiallisten reaktioiden suhteen on tähän mennessä ehdotettu useita menetelmiä ja toteutusmuotoja sen havaitsemiseksi, millä heidelbergerkäyrän osalla annettu analyysinäyte sijaitsee.

Seuraavassa esitetään eräitä esimerkkejä:

1. Vanhin ja varmin menetelmä antigeeniyliäärän havaitsemiseksi on kaksoismäärityksen suorittaminen kahdella erilaisella näytelaimennuksella. Antigeeniyliäärän esiintyessä saadaan suuremmalla laimennuksella suurempi signaali ja havaitaan näennäisesti suurempi proteiinipitoisuus kuin väkevöidymmällä näytteellä. (H.E. Schultze ja G. Schwick; Prot. Biol. Fluids 5, 15-25 (1958)).

Tämän menetelmän parannetuissa toteutusmuodoissa käytetään vasta-aineiden jatkolisäystä testinäytteeseen, kun reaktio on saavuttanut määrätyn tasapainon. Antigeeniyliäärän esiintyessä tapahtuu tällöin signaalin kasvu (T.O. Tiffany et al., Clin. Chem. 20, 1055-1061 (1974)). Antigeeniyliäärä voidaan myös havaita jälkiannostelemalla tunnetun pitoisuuden omaavaa antigeenimateriaalia (J.C. Sternberg; Clin. Chem. 23, 1456-1464 (1977)).

2. Erikoisessa jatkuvaa virtausta käyttävässä tekniikassa havaitaan antigeeniyliäärän esiintyminen kaksoishuipun avulla (R.F. Ritchie; Protides Biol. Fluids 21, 569 (1974)).

3. Tarkastelemalla reaktiokinetiikkaa reaktion kulun graafisen esityksen avulla voidaan eroittaa turbidimetristä mittausta käyttäen toisistaan antigeeniyliäärä ja "heikko" antigeeniyliäärä (I. Deverill; Protides Biol. Fluids 26, 697 (1979)). (P. J.J. Van Munster et al., Clin.

Chim. Acta 76, 377-388 (1977)).

4. Määräämällä reaktion kesto aika maksimaalisen reaktionopeuden esiintymiseen asti nefelometrisen mittauksen avulla voidaan laskea suure, joka sallii eroittelun antigeeni- ja vasta-ainei ylimäärän välillä (DE-A 27 24 722 C2).

Kohdissa 2 ja 4 mainitut menetelmät eroavat edullisesti muista menetelmistä siten, että ei tarvitse tutkia kaikkia näytteitä antigeeniylimäärän esiintymisen suhteen, vaan mittaustapahtuman aikana saadaan tietoa siitä, täytyykö suorittaa antigeeniylimäärän määrittäminen.

Menetelmä 2 on sidottu määrittäytyn tekniikkaan eikä voida käyttää yleisesti nefelometrista tai turbidimetristä näytemäärittäystä.

Tekniikan nykyisen tason mukaan DE-A-27 24 722 C2 lähtee siitä, että on olemassa maksimaalisen reaktionopeuden funktio, joka sallii tämän funktion kynnysarvon avulla eroittelun antigeeniylimäärän ja vasta-ainei ylimäärän välillä (patenttivaatimus 1). Tämän patenttikirjoituksen kappaleessa 12 rivit 8-21 esitetään, että eroittelufunktiona voidaan käyttää aikaa (T), joka ulottuu reaktion alkamisesta reaktionopeuden maksimaaliarvon (H) esiintymiseen. Näitä toteutuksia rajoitetaan kuitenkin voimakkaasti kappaleessa 21 rivit 55-68, missä todetaan, että ei ole olemassa mitään yksittäistä aika-arvoa, jonka mukaan käyrän vasta-ainei ylimääräosa sijaitseisi tämän arvon yhdellä puolella ja käyrän antigeeniylimääräosa sijaitseisi sen toisella puolella. Keksintö ratkaisee vaikeuden koordinaattimuunnoksen ja uusien muuttujien käytön avulla.

Menetelmälle on edelleen tunnusomaista se, että antigeeniylimäärätilan toteamiseksi toistetaan mittaus näytteen asianmukaisen laimennuksen mukaan vasta-ainei ylimäärätilan saavuttamista varten. Tämä näytteen lisämittaus, jolloin todetaan antigeeniylimäärätilanne, on materiaalia ja aikaa vaativa.

Keksinnön perustana on siten tehtävänä menetelmän kehittäminen, joka sallii ilman lisämittausta näytteen antigeeni tai vasta-ainepitoisuuden määrittämisen, myös jos tämä antigeeniyliäärätilanne vallitsee kulloisessakin testinäytteessä.

Yllättävästi on nyt havaittu, että mittaamalla aika, joka ulottuu reaktion alkamisesta reaktionopeuden maksimiarvon esiintymiseen asti, voidaan kinettisen menetelmän avulla, so. määräämällä suurin reaktionopeus pitoisuuden funktiona, suorittavaa kvantitatiivinen mittaus heidelberger-käyrän molemmilta puolilta. Vasta-aineyliäärän ja antigeeniyliäärän välinen eroittelu ei enää ole välttämätöntä.

Keksinnön kohteena on siten johdannossa esitetyn tyyppinen menetelmä, jolle on tunnusomaista, että kahdesta mahdollisesta pitoisuudesta valitaan oikea pitoisuus toisen reaktioparametrin, $V_{\max}$ tai $t_{\max}$, avulla.

Riippuvuus pitoisuuden ja $V_{\max}$ -arvon sekä $t_{\max}$ -arvon välillä voidaan esittää esimerkiksi taulukon, matriisin tai yhden tai useamman matemaattisen funktion avulla.

Tiedetään, että reaktionopeuteen ja signaalin voimakkuuteen antigeenivasta-aine-reaktioissa voidaan vaikuttaa laajalla alueella reaktioväliaineen ionivoimakkuuden, ionilaadun ja polymeerilisäyksen avulla. Seuraava esitys ei siten rajoitu esimerkeissä esitettyihin olosuhteisiin vaan kohdistuu saostusreaktioihin, joihin voidaan vaikuttaa edellämainitussa mielessä.

Jos määrätään maksimireaktionopeus ($V_{\max}$) pitoisuudesta riippuvaisena, saadaan kuviossa 2 esitetty riippuvuus. Jos samanaikaisesti määrätään $V_{\max}$ -arvon kanssa aika, joka kuluu reaktion alusta $V_{\max}$ -arvon saavuttamiseen ($t_{\max}$), saadaan kuviossa 3 esitetty riippuvuus. Molemmat signaali/pitoisuuskäyrät esittävät antigeenin ylimäärän tapausta; mitatut signaalit voidaan osoittaa kahdelle pitoisuudelle.

Jos molemmat funktiot projisoidaan yhdeksi kuvaksi (kuvio 4), havaitaan, ettei esiinny arvopaperia ($V_{\max}$, $t_{\max}$), joka vastaisi kahta erilaista pitoisuutta.

5 Maksimireaktionopeus ($V_{\max}$) ja aika maksimireaktionopeuden ($t_{\max}$) saavuttamiseen ovat ilmeisesti toisistaan riippumattomia pitoisuuden funktioita ja heidelberger-käyrä on kolmiulotteinen käyrä (kuvio 5), jossa ei suoritettaessa reaktio sopivasti esiinny kaksikäsitteisyttä pitoisuuden suhteen.

10 Mittausmenetelmissä, joissa käytetään vain tämän käyrän kaksiulotteista projektiota, esimerkiksi $V_{\max}$ -arvon mittausta pitoisuuden funktiona (käyrä 6) esiintyy aina kaksikäsitteisyttä pitoisuuden suhteen.

15 Havaittujen riippuvuuksien käytännöllistä arviointia varten on huomioitava, että signaali/pitoisuus-käyrän minimija maksimi-arvon läheisyydessä voidaan pitoisuus mitata vain alentuneella tarkuudella, koska verrattain pienet signaalierot vastaavat suuria pitoisuuseroja. Uudessa menetelmässä mitattaessa kahta riippumatonta mit-

20 tesignaalia paranee tarkkuus erikoisesti silloin, kun pitoisuusfunktion $f(t_{\max})$ minimiarvo on mahdollisimman kaukana pitoisuusfunktiona $f(V_{\max})$ maksimi-arvosta.

Uuden menetelmän työtapaa ja reaktio-olosuhteita esitellään seuraavissa esimerkeissä.

25 Esimerkki 1

Kalibroitikäyrän maksimialueen määrittäminen IgG:tä varten.

Fotometri: DU-8 varustettuna lisäosalla nefelometrisiä mittauksia varten (Beckman Instruments).

30 Reaktioväliaine: 0,02 mol/l kaliumfosfaattipuskuria, pH-arvo 7,3 40 g/l kanssa polyetyleeniglykolia 6000 (Serva), Heidelberg, Saksan Liittotasavalta ja 64 g/l natriumbromidia.

35 Näytteen laimennusaine: fysiologinen NaCl-liuos.
Antiseerumi: LN- antiseerumi ihmisen IgG/kappa-ket-

jua vastaan (kaniineilta) Behringwerke AG, OSAS 14), laimennettu suhteessa 1:31 reaktioväliaineella.

Standardi: T-proteiini-standardiseerumi (ihmisen), (Behringwerke AG, OSKT 06).

5

Testinäyte: 20 mikrolitraa näyte/standardi-laimennusta sekoitetaan 500 mikrolitran kanssa antiseerumilaimennusta ja mitataan välittömästi fotometrissa käyttäen Kinetik II ohjelmaa korkeintaan 3 minuuttia aaltopituudella 224 nm.

10

a) turbidimetrinen mittaus

Standardilaimennuk- Maksimireaktio- Aika reaktion alus-			
sen pitoisuus mg/dl nopeus ($V_{\max}$ mE/ ta maksimin esiin			
5	IgG	min	tymiseen ($t_{\max}$, s.)
10	110,4	425	38
	92	466	30
	78,9	542	24
	73,6	569	20
	69	583	18
	64,9	576	16
15	61,3	567	16
	55,2	548	14
	22,1	219	20
	11,0	75	30

b) nefelometrinen mittaus

Standardilaimennuk- Maksimireaktio- Aika reaktion alus-			
sen pitoisuus mg/dl nopeus ($V_{\max}$ E/ ta maksimin esiin			
20	IgG	min	tymiseen ($t_{\max}$, s.)
25	110,4	1410	36
	92	1490	30
	78,9	1710	22
	73,6	1730	22
30	69	1780	20
	64,9	1800	20
	61,3	1810	20
	55,2	1720	18
35	22,1	706	24
	11,0	325	42

Esimerkki 1 osoittaa, että sekä turbidimetrisessä että myös nefelometrisessä mittauksessa voidaan määrittää pitoisuudet yksikäsitteisesti heidelberger-käyrän maksimikohdassa ja sen molemmiin puolin. Tuntemattoman näytepitoisuuden määrittämiseksi interpoloidaan $V_{\max}$ - ja $T_{\max}$ -arvojen mittauksen jälkeen taulukoitujen standardiarvojen väliltä. Mittausalue määrätään laimentamalla sopivasti näytteitä, esimerkissä 1 näytteen laimennuksella 1:51 on se 560-5600 mg/dl IgG ja voidaan se valita siten, että osa-alue, jossa tarkkuus on vähäisempi, ei osu vastaavan parametrin kliinisesti merkittävään päätösalueeseen.

Esimerkki 2

Kalibroitikäyrän mittaus IgM:lle (turbidimetrisesti)

15 Fotometri: DU-8 (Beckman Instruments) Reaktioväliaine: 0,15 m NaCl-fosfaattipuskuria, pH-arvo 7,2 yhdessä 39 g/l kanssa PEG 6000 (Serva) ja 8 g/l NaCl

Näytteen laimennusväliaine: fysiologinen NaCl-liuos

Antiseerumi: LN-antiseerumi ihmisen IgM/ μ -ketjua vastaan (kaniineista) (Begringwerke AG, OSAT 14), laimennettu suhteessa 1:11 reaktioväliaineella

20 Standardi: T-proteiini-standardiseerumi (ihmisen), (Behrinwerke AG, OSKT 06)

Testinäyte: 200 mikrolitraa näyte/standardilaimennusta sekoitetaan 500 mikrolitran kanssa antiseerumilaimennusta ja mitataan välittömästi fotometrissa käyttäen Kinetik II ohjelmaa korkeintaan 3 minuuttia aallonpituudella 312 nm.

25

Standardilai- Näytteen pi- Maksimireak- Aika reaktion
mennuksen pi- toisuus lai- tionopeus alusta maksi-
toisuus, mg/dl mennuksella (V_{max}), mE/ miin (t_{max} , s)
IgM 1:21 mg/dl min

5

	110	2310	371	34
	74	1540	508	28
10	55	1155	591	18
	44	924	639	14
	37	770	639	12
	31	660	620	12
	28	578	611	10
15	24	513	598	10
	22	462	556	10
	20	420	508	10
	18	385	488	10
	17	355	467	10
20	16	330	460	10
	15	308	419	10
	14	290	405	10
	13	272	378	10
	12	257	368	10
25	11	231	330	10
	5,5	116	158	10
	2,8	58	69	10
	1,4	29	27	12

30

Esimerkistä 2 voidaan havaita, että valitulla näytteen laimennuksella voidaan mitata pitoisuus välillä 30-600 mg/dl IgM suuremmalla tarkuudella kuin välillä 600-900 mg/dl. Normaalialueella välillä 70-300 mg/dl IgM seerumissa ovat kuitenkin suuremmatkuin 600 mg/dl olevat arvot aina epäiltävän lähellä monoklonaalista gammopatiaa ja vaativat siten arvojen tarkkuudesta riippumatta jatkotutkimuksia.

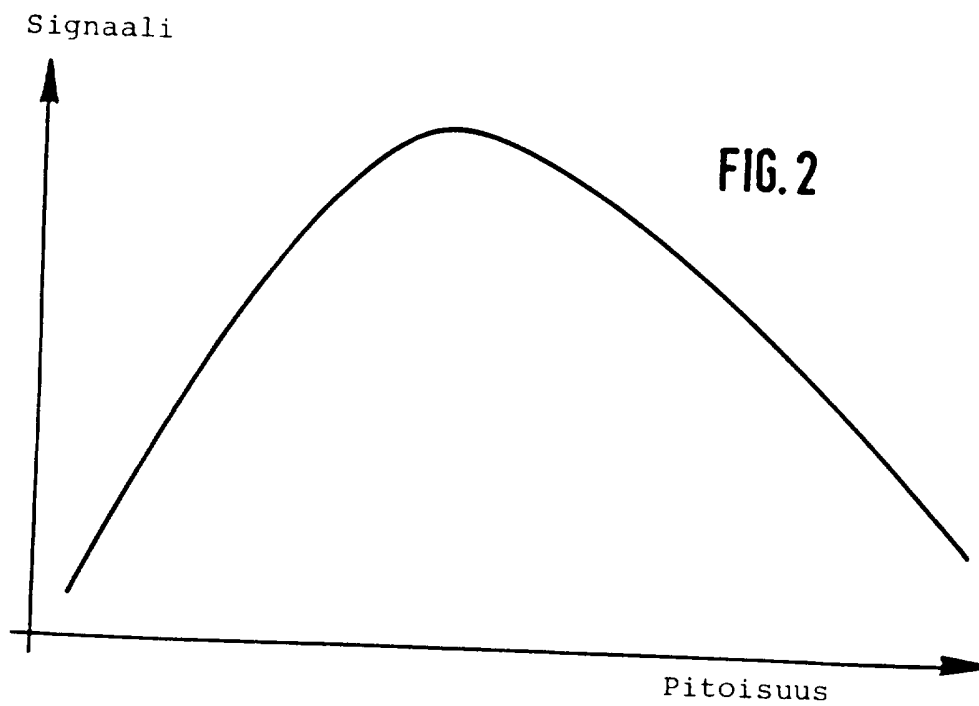
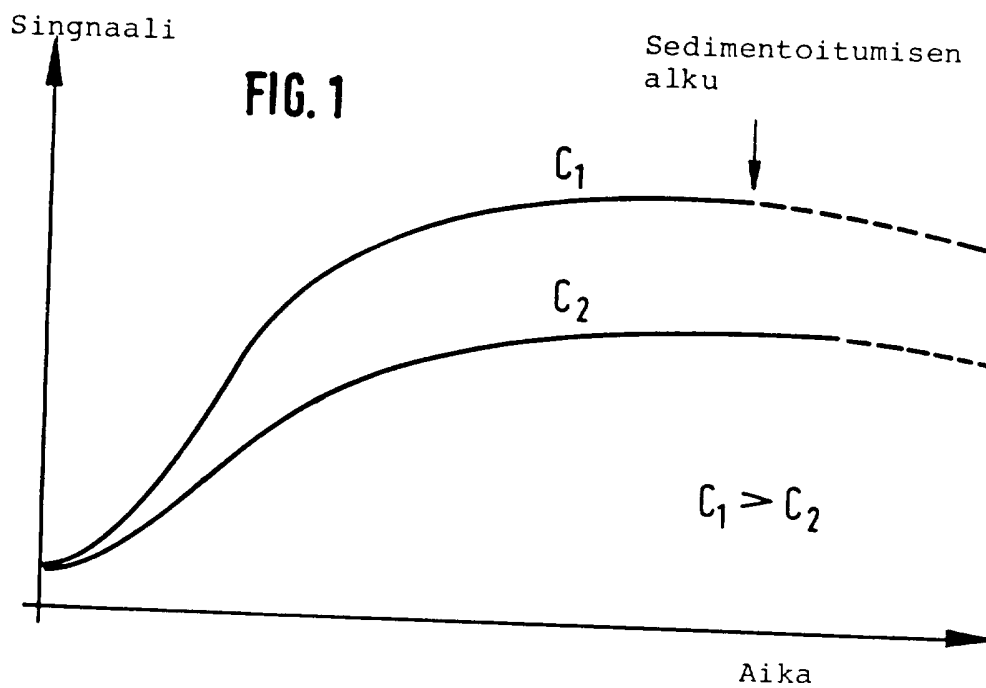
35

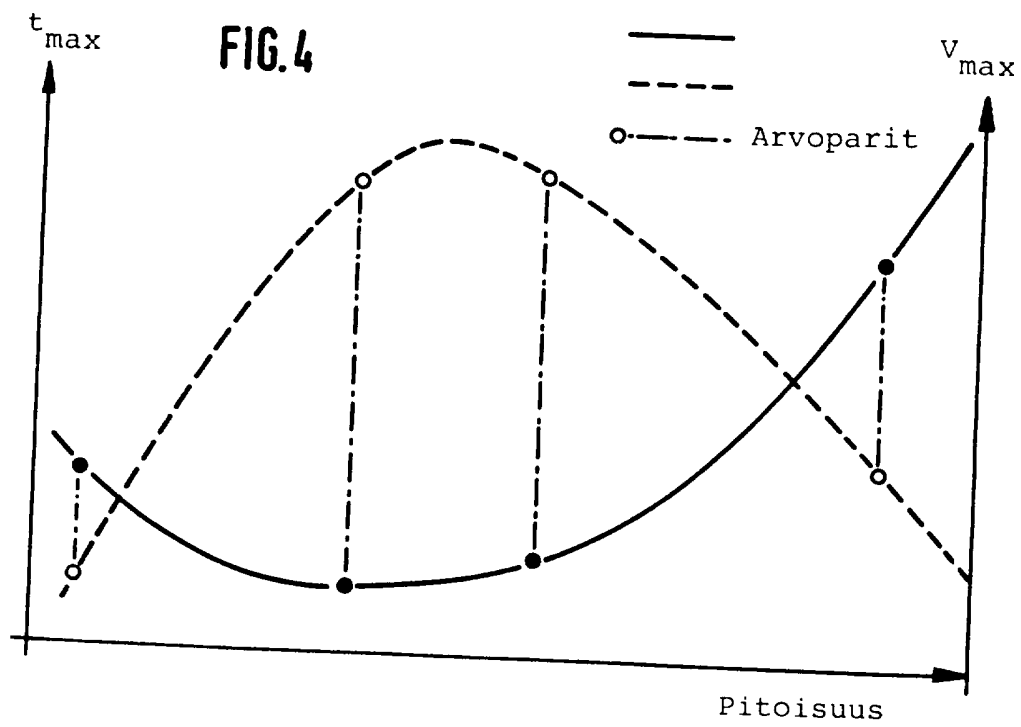
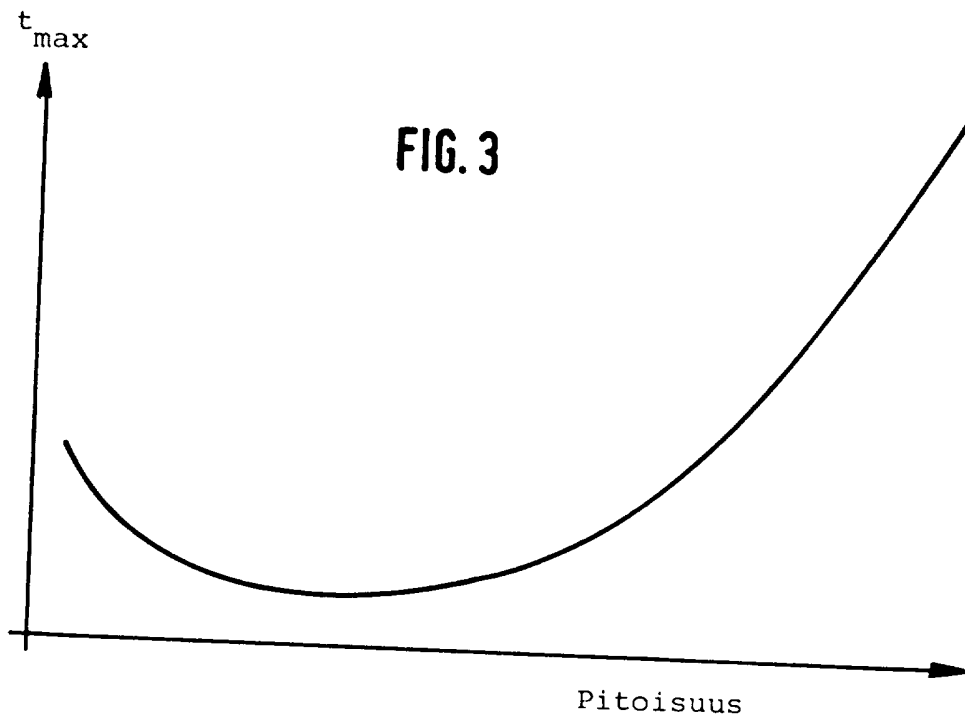
Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä yhden reaktantin pitoisuuden fotometristä määrittystä varten reaktiossa, joka etenee muodostaen tai kuluttaen sirontakeskuksia siirtymän aikaansaamiseksi
5 Rayleigh-sironnasta Mie-sirontaan, jolloin mitataan suurin reaktionopeus $V_{\max}$ ja aika $t_{\max}$ reaktion alusta suurimman reaktionopeuden esiintymiseen, pitoisuuden yksikäsitteistä määrittystä varten määrätään empiirisesti funktionaalinen
10 riippuvuus pitoisuuden, $V_{\max}$ -arvon ja $t_{\max}$ -arvon välillä standardivalmisteen avulla, sekä mitataan näytteen $V_{\max}$ - ja $t_{\max}$ -arvot, t u n n e t t u siitä, että kahdesta mahdollisesta pitoisuudesta valitaan oikea pitoisuus toisen reaktioparametrin, $V_{\max}$ tai $t_{\max}$, avulla.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktio on immuunikemiallinen reaktio.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fotometrinen määrittys suoritetaan valon läpikulkumenetelmän avulla.
- 20 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fotometrinen määrittys suoritetaan käyttäen säteilyä, jonka aallonpituus on 240-700 nm, edullisesti kuitenkin välillä 300-380 nm.
- 25 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fotometrinen määrittys suoritetaan sirontavalon mittauksen (nefelometrisen mittauksen) avulla.

Patentkrav

1. Förfarande för fotometrisk bestämning av koncen-
trationen hos en reaktant i en reaktion, vilken förlöper
5 under bildande eller förbrukande av spridningscentra för
åstadkommande av en övergång från Rayleigh- till Mie-
spridning, varvid den maximala reaktionshastigheten ($V_{\max}$)
och tiden från inledandet av reaktionen fram till uppträ-
dandet av den maximala reaktionshastigheten ($t_{\max}$) be-
10 stäms, för entydigt bestämning av koncentrationen meddelas
funktionella sammanhanget mellan koncentrationen, $V_{\max}$ och
 $t_{\max}$ empiriskt medelst ett standardpreparat, $V_{\max}$ och $t_{\max}$
mäts i provet, k ä n n e t e c k n a t därav, att av två
15 möjliga koncentrationer väljs rätt koncentration medelst
den andra reaktionsparametern, $V_{\max}$ eller $t_{\max}$.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att reaktionen är en immunokemisk
reaktion.
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att den fotometriska bestämningen
ut förs medelst en genomlysningsmätning.
4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den fotometriska bestämningen
utförs med en strålning som har en våglängd av 240 - 700
25 nm, företrädesvis dock 300 - 380 nm.
5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den fotometriska bestämningen
utförs medelst en spridningsljusmätning (nefelometriskt
förfarande).





81 448

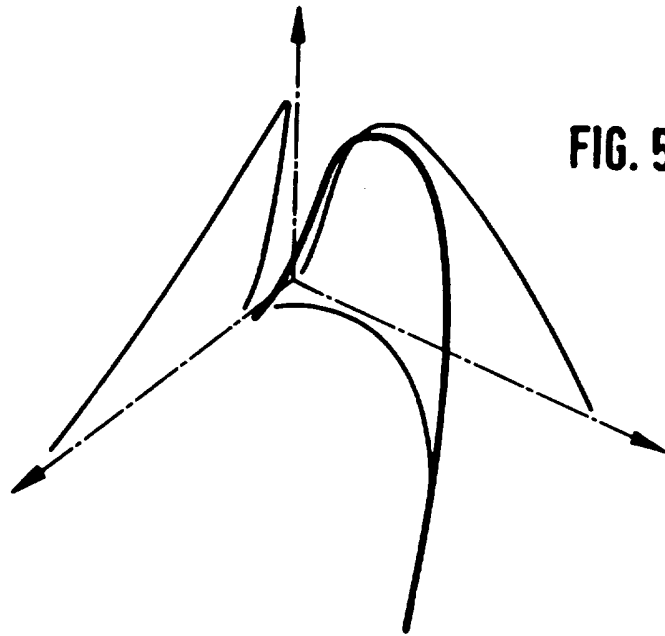


FIG. 5

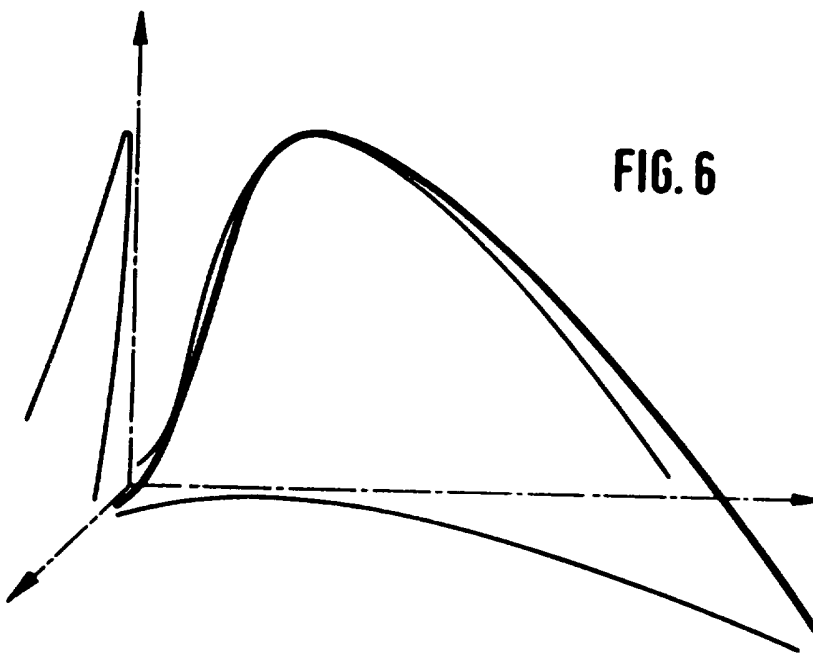


FIG. 6