

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 147163 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 3031/72

(51) Int.Cl.³: C 12 Q 1/00

(22) Indleveringsdag: 16 jun 1972

(41) Alm. tilgængelig: 19 dec 1972

(44) Fremlagt: 30 apr 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 18 jun 1971 DE 2130308

(71) Ansøger: *BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; 68 Mannheim - Waldhof, DE.

(72) Opfinder: Alexander *Hagen; DE, Hans Ulrich *Bergmeyer; DE, Wolfgang *Gruber; DE, Klaus *Beaucamp; DE, Dieter *Jaworek; DE.

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) **Fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af enzymatisk reagerende stoffer og apparat til udførelse af fremgangsmåden**

Opfindelsen omhandler en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af enzymatisk reagerende stoffer i vandig opløsning ved omsætning i nærværelse af mindst ét enzym samt et apparat til gennemførelse af denne fremgangsmåde.

Enzymatisk reagerende stoffer bliver såvel i teknikken som også i det kliniske laboratorium i stort antal løbende kvantitativt bestemt under udnyttelse af deres egenskab til ved bestemte enzymer selektivt at blive således omsat, at der i den vandige opløsning fremkommer en med mængden af det søgte stof proportional ændring, som er let at måle. Denne ændring kan eksempelvis bestå i, at der optræder eller forsvinder bestemte forbindelser, eller i ændringen

DK 147163 B

af specielle egenskaber, som pH-værdien og lignende. Ved sådanne bestemmelser foreligger der ganske almindeligt det problem at opnå en så hurtig og simpel gennemførelse som mulig. Navnlig skulle bestemmelsen være gennemført uden anvendelse af særlige rensnings- og isoleringsmetoder. Dette mål blev navnlig tilstræbt ved udviklingen af analyseautomater, i hvilke de ønskede reaktioner forløber vidtgående automatiseret på en rolig måde og kan måles.

De hidtil her udviklede metoder og apparater har dog endnu væsentlige ulemper. Disse består navnlig i, at analysefrekvensen endnu er for ringe og omfatter arbejdsstrin ved den til analysen indbragte prøve, som har væsentlig indflydelse på nøjagtigheden af resultatet, og som gør reagensforbruget, navnlig forbruget af enzymer uønsket stort.

Det er en opgave for den foreliggende opfindelse at fjerne disse ulemper og at fremskaffe en metode og et apparat, som udelukker fejlkilder ved doseringen af det nødvendige stof, f. eks. ved pipettering, afmåling og lignende, samt at opnå en meget høj analysefrekvens med et mindste forbrug af reagenser. Særlig er det også en opgave for opfindelsen teknisk at nyttiggøre den egenskab hos enzymerne, at de som katalysatorer praktisk talt ikke opbruger sig ved en fremgangsmåde af den ovennævnte art.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er af den art, ved hvilken en vandig opløsning af det stof, der skal bestemmes, indføres i en med konstant hastighed cirkulerende pufferopløsning, der indeholder de for omsætningen nødvendige reagenser, idet opløsningen bringes i kontakt med enzymet, hvorefter den ledes over en detektor, der måler den ved omsætningen fremkaldte forandring i opløsningen, og pufferopløsningen tilbageføres i kredsløbet, idet de forbrugte reagenser eventuelt regenereres, og det ejendommelige ved fremgangsmåden er, at en bestemt mængde af opløsningen af det stof, der skal bestemmes, indgives luftblærefrit i pufferopløsningen som en blok uden ændring af strømningshastigheden.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen egner sig i almindelighed til en kvantitativ bestemmelse af i vandig opløsning enzymatisk reagerende

stoffer, forudsat at der ved denne omsætning fås en forandring i opløsningen, som fysisk kan måles, og som er proportional med omsætningen henholdsvis med den mængde af stoffet, der skal bestemmes. Ved kvantitativ bestemmelse skal også forstås bestemmelsen af enzymaktiviteter. Sådanne stoffer og omsætninger er kendt i stort antal. Eksempler herpå er omsætninger, som lader sig således koble med oxydationen af det reducerede nicotinamin-adeninucleotid (NADH henholdsvis NADPH), at ændringen af ekstinktionen af NADH er proportional med omsætningen. På denne måde kan eksempelvis acetaldehyd, pyruvat, sorbose, oxalacetat, α -ketoglutarat, glutamat-pyruvat-transaminase (GPT), glutamat-oxalacetat-transaminase (GOT) o. s. v. bestemmes.

Andre lignende reaktioner er bestemmelsen af urinstof med urease og måling af det dannede ammoniumcarbonat, eksempelvis ved bestemmelse af ammoniumionkoncentrationen. Dernæst omsætning af saccharose med invertase og måling af den optiske drejning med polarimeter. Dernæst spaltning af lipider ved hjælp af lipase under dannelse af fedtsyrer og bestemmelse af ændringen i pH-værdi ved hjælp af glaselektrode, bestemmelse af pyrophosphat ved spaltning med pyrophosphatase under dannelse af orthophosphat eller bestemmelse af glucose ved hjælp af med glucoseoxydase katalyseret oxydation og måling af varmetoningen i kalorimeter. Fremdeles oxydation af glucose eller galactose, urinsyre, xanthin, hypoxanthin, cytochrom A, aminosyrer, polyumættede fedtsyrer med specifikke oxydaser og måling af nedgangen i oxygenkoncentration ved hjælp af oxygenelektrode. Fremdeles bestemmelse af hydrogenperoxyd og uorganiske peroxyder ved hjælp af katalase og måling af det dannede oxygen, ligeledes ved hjælp af oxygenelektrode, bestemmelse af aminosyrer med aminosyredecarboxylase og måling af det dannede CO_2 eller af varmetoningen ved reaktionen med kalorimeter o.s.v.

Til de ovenanførte omsætninger under oxygenforbrug egnede enzymer er f. eks. glucoseoxydase, galactoseoxydase, uricase, xanthinoxydase, cytochromoxydase, aminosyreoxydase og lipoxygenase.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen indførte enzymer kan enten foreligge opløst i den kontinuerligt cirkulerende opløsningsstrøm

eller som bærerbundne uopløselige enzymer som partikler i form af et leje f. eks. være anbragt som søjle i opløsningsmiddelstrømmen. Anvendes der et opløst enzym, bliver der ved egnede midler fremkaldt en ringe sammenblanding af den blokagtigt indførte prøveopløsning (opløsningen af det stof, der skal bestemmes) med den kredsende strøm. Sammenblandingen kan eksempelvis ske ved hvirveldannelse med mekaniske hindringer i opløsningsstrømmen. Sammenblandingen skal holdes muligt ringe for ikke at forringe analysefrekvensen og følsomheden af metoden. Den må blot finde sted i et sådant omfang, at en kontakt af det stof, der skal bestemmes, med de til reaktionen nødvendige stoffer er sikret, og at den for enzymets aktivitet ønskede pH-værdi indstiller sig.

Ved anvendelse af et bærerbundet uopløseligt enzym, som er indskudt mellem applikator og detektor i opløsningsstrømmen, sker den ønskede sammenblandingsgrad uden videre ved den i enzymlejet stedfindende blandingsproces henholdsvis ophvirvling. I dette tilfælde kan også sammenblandingen være særlig ringe, da en tilfredsstillende kontakt med enzymet i alt fald er sikret.

Hvis et bærerbundet enzym anvendes, bør den specifikke aktivitet i det mindste beløbe sig til 10 U/g, fortrinsvis mere end 50 U/g, for at undgå et stort søjlevolumen og dermed en stærk opblanding af prøve-"blokken" med pufferopløsningen.

Et væsentligt kendetegn ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i den luftblærefri, blokagtige indføring af den opløsning, som indeholder det stof, der skal bestemmes, i pufferopløsningsstrømmen. Opløsningen skal derved under muligt ringe opblanding med pufferopløsningen indføres således, at den vandrer som en væskeprop i den flydende strøm. En sådan indføring kan f. eks. opnås ved hjælp af en skyder, som i en boring indeholder den afmålte mængde af opløsningen og indføres således i den flydende pufferopløsningsstrøm, at prøveopløsningen medtages blokagtigt eller propagtigt i pufferopløsningen.

Et yderligere væsentligt kendetegn ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at der anvendes en med konstant hastighed flydende strøm af en egnet pufferopløsning som bærer og reaktionsmiddel for

omsætningen. Ved konstant hastighed skal der her forstås en sådan konstanthed i hastigheden, ved hvilken de uundgåeligt optrædende hastighedsvariationer er så ringe, at de praktisk talt ikke registreres af det med detektoren forbundne registreringsinstrument. Denne betingelse er ideelt opfyldt, når der findes konstante betingelser, så længe ingen prøveopløsningsblok passerer detektoren. Hvis denne konstante hastighed ikke kan realiseres, kan der ved det stadigt registrerende instrument i forbindelse med detektoren tages fejl af en omsætning. En sådan ændring kan også blive misforstået, når der ved indføringen af prøveopløsningen bringes luftblærer ind i reagensstrømmen.

Det er yderligere væsentligt, at den blokagtige indføring af prøveopløsningen ikke fremkalder nogen ændring i strømningshastigheden af den med konstant hastighed flydende strøm af pufferopløsningen, da der herved opstår fare for en forfalskning af måleresultatet.

En foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden består i regenereringen af de forbrugte komponenter efter gennemløbet af detektoren. Foruden at pufferopløsningsstrømmen ompumpes konstant i kredsløb, er det fordelagtigt også at supplere de brugte komponenter. Bliver f. eks. fremgangsmåden gennemført under anvendelse af et stof, der under oxygenforbrug oxyderes, kan oxygenindholdet i pufferopløsningen igen suppleres, idet der eksempelvis gennemledes luft. Dette sker hensigtsmæssigt i en noget større beholder med tilsvarende opholdstid for pufferopløsningen. Hvis det stof, der skal bestemmes, reduceres under forhøjelse af oxygenindholdet i opløsningen, fjernes det dannede oxygen igen, idet der på tilsvarende måde gennemledes en oxygenfri bærer gas, f. eks. nitrogen eller en inaktiv luftart.

Bliver f. eks. NADP reduceret til NADPH (som i eksemplet på glucosebestemmelse ved den koblede hexokinase-glucose-6-phosphat-reaktion), kan dannet NADPH løbende reoxyderes til NADP ved en redox-bytter, der er indskudt som en søjle efter detektoren i strømmen. Hydrerede pyridincoenzymer (NADH og NADPH) kan også reoxyderes med bærerbundet glutamat-dehydrogenase (søjle i strøm), når man til det kredsende reagens sætter NH_4^+ -ioner og α -ketoglutarat. Disse stoffer forstyrrer i almindelighed ikke den reaktion, der skal måles.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan dog også gennemføres uden løbende regenerering, indtil de omsatte komponenter er forbrugt, eller der ophober sig sådanne reaktionsprodukter, at den ved bestemmelsen benyttede reaktion forstyrres. Der bliver så enten regenereret diskontinuerligt, eller pufferopløsningen bliver udvekslet.

Selve pufferopløsningen er en vandig opløsning af en til det stadigt anvendte enzym egnet stødpude i passende koncentration. De egnede stødpuder og pufferkoncentrationer samt de gunstige pH-værdier for de stadigt anvendte enzymer er i almindelighed bekendte.

Pufferopløsningen kan eventuelt indeholde endnu andre stoffer foruden de pufrende forbindelser, som er nødvendige eller krævede for den enzymatiske proces. Eksempler på sådanne er salte, som indeholder de nødvendige ioner, som f. eks. magnesiumioner, sulfationer og lignende eller stabiliserende virkende forbindelser, overfladeaktive stoffer og lignende. Fremdeles indeholder pufferopløsningen alle de stoffer i opløst tilstand, som også er nødvendige for eventuelle koblede reaktioner, som samtidig foregår. Navnlig indeholder den enzymer og substrater for sådanne reaktioner. Bliver der eksempelvis målt glutamat-pyruvat-transaminase (GPT), så bliver L-alanin og α -ketoglutarat opløst i pufferopløsningen og omdannes ved det prøven tilsatte enzym til glutamat og pyruvat. Pyruvatet bliver igen i nærværelse af hjælpe- henholdsvis indikatorenzymet lactatdehydrogenase (LDH) og af NADH omdannet til L-lactat under dannelse af NAD^+ , idet den ved bortgangen af NADH optrædende ændring af ekstinktionen i det ultraviolette måles. Hvis glutamat-oxalacetat-transaminase (GOT) skal bestemmes, bliver der tilsat pufferopløsningen L-aspartat og α -ketoglutarat, som af det tilsatte GOT overføres til oxalacetat og glutamat. Det dannede oxalacetat bliver ved det i opløsningsstrømmen kredsende eller bærerbundne enzym malatdehydrogenase overført til malat, idet det samtidigt i opløsningen værende NADH igen omdannes til NAD.

Den blokagtige indbringning af prøveopløsningen uden ændring af strømningshastigheden bliver ifølge opfindelsen fortrinsvis gennemført således, at pufferopløsningen opdeles i to delstrømme, at delstrømmene afvekslende afbrydes, og at en bestemt mængde af op-

løsningen, der indeholder det stof, der skal bestemmes, indføres i en delstrøm, medens denne er afbrudt. Særlig gunstigt er det her at tilsætte prøveopløsningen til selve afbrydelsesstedet. Her bliver der fortrinsvis tilsat et overskud af prøveopløsning, f. eks. af serum, og overskuddet afgrænses ved åbning af delstrømmen. Dette kan f. eks. ske som allerede antydnet ovenfor, idet der i en delstrøm af pufferopløsningsstrømmen indsættes en skyderagtig indretning, hvis skyder har en til optagelse af en bestemt mængde prøveopløsning justeret boring. Ved neddykning af denne skyderåbning i et overskud af prøveopløsningen, f. eks. et overskud af prøveserum, eller ved at åbne boringen til en større beholder, der indeholder denne prøveopløsning, og ved at man lader prøven flyde ind, bliver der fraskilt en afmålt mængde prøveopløsning ved forskydning af skyderen og indført blokagtigt i pufferopløsningsstrømmen, når skyderens boring anbringes således i den afbrudte delstrøm af pufferopløsningen, at der ved denne boring sker en åbning af den afbrudte strøm. Fortrinsvis bliver herved samtidig den anden, til dette tidspunkt ikke afbrudte delstrøm afbrudt, hvad der kan ske ved hjælp af den samme skyder.

Et apparat ifølge opfindelsen til udførelse af den ovenfor beskrevne fremgangsmåde er kendetegnet ved et pufferreservoir, en prøveapplikator med i det mindste to ved en spærreskyder med mindst to korresponderende boringer afvekslende spærrebare gennemløb, idet den ene af boringerne står i forbindelse med en tilløbsledning for opløsningen af det stof, der skal bestemmes, når dets tilsvarende gennemløb er spærret, en blandeindretning og en detektor med registreringsinstrument samt pumpe med konstant ydelse, som er indbyrdes forbundne med rørledninger til et kredsløbssystem.

Prøveapplikatoren har fortrinsvis i det mindste to ved en spærreskyder med i det mindste to korresponderende boringer afvekslende spærrebare gennemgange, idet den ene af boringerne står i forbindelse med en tilløbsledning for opløsningen af det stof, der skal bestemmes, når den korresponderende gennemgang er spærret.

I en foretrukket udførelsesform står applikatoren i forbindelse med en et vakuum leverende indretning, f.eks. en vakuumpumpe, med hvilken tilførselsledningen for prøveopløsningen og prøveboringen i skyderen kan evakueres.

I en foretrukket udførelsesform ifølge opfindelsen består applikatoren af et hylster med forskydelig kerne, og hylster og kerne har hver tre gennemløb, som ved forskydning af kernen kan blive bragt til dækning. Særlig hensigtsmæssig er en sådan applikator, som er kendetegnet ved et hylster med indløbsboringer, udløbsboringer, luftindføringsboring, en tragtformet boring for indfyldning af prøven og vakuumboring samt en i hylsteret forskydelig kerne med boringer, som er således anbragt, at ved forskydning af kernen kan den første indgangsboring forbindes med den første udgangsboring, den anden indgangsboring med den anden udgangsboring, luftindgangsboringen med vakuumboringen og prøveopløsningsboringen med vakuumboringen, idet dog ikke samtidigt den første indgangsboring kan forbindes med den første udgangsboring og den anden indgangsboring med den anden udgangsboring.

Fremdeles indeholder apparatet en pumpe med konstant ydelse, fortrinsvis i ledningen foran eller bag ved applikatoren. Her kan der eksempelvis anvendes en slangepumpe.

Fremdeles indeholder apparatet hensigtsmæssigt i ledningen mellem applikator og detektor en blandeindretning, som f.eks. kan bestå af en søjle, der indeholder det partikelformede bærebundne enzym. Ved anvendelse af et opløst enzym består blandeindretningen hensigtsmæssigt af en simpel indsats i rørledningen, der forårsager en vis hvirveldannelse i den gennemstrømmende opløsning.

Fremgangsmåden og apparatet ifølge opfindelsen bliver i det følgende nærmere forklaret ved hjælp af den vedføjede tegning. I denne er:

fig. 1 et skematisk billede af apparatet ifølge opfindelsen,

fig. 2 et skematisk billede af føringen af pufferopløsningsstrømmen ved detektoren,

fig. 3 et billede af blandeindretningen i snit,

fig. 4 henholdsvis fig. 4a et billede af en applikator ifølge opfindelsen med forbindelsesledninger i perspektiv henholdsvis i længdesnit,

fig. 5 en ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen erholdt målekurve,
fig. 6 den af målekurven i fig. 5 fremkomne justerede kurve,
fig. 7 en justeret kurve til en anden udførelsesform af opfindelsen,
fig. 8 en målekurve til en yderligere udførelsesform af opfindelsen,
fig. 9 den justerede kurve til den i fig. 8 angivne målekurve,
fig. 10 en yderligere målekurve og
fig. 11 en yderligere justeret kurve.

Som angivet i fig. 1 indeholder reservoiret R et forråd af pufferopløsning. Pumpen P fører pufferopløsningen fra reservoiret R ind i prøveapplikatoren A og derfra over blandingsindsatsen S videre ind i detektoren D samt i tilslutning hertil igen tilbage til reservoiret. I den viste udførelsesform er der ved detektoren tilsluttet en elektronisk forstærker V, som forstærker målesignalerne fra detektoren, og et registreringsinstrument G, til hvilket de forstærkede målesignaler videreføres, og som eksempelvis kan være en skriver.

Reservoiret R kan bestå af en passende beholder, som har en afgangsåbning og en tilgangsåbning til pufferopløsning samt hensigtsmæssigt en åbning til indføring af supplerende stoffer, luftarter og lignende. Reservoiret er fortrinsvis i termostat. Pumpen P, som tjener til føring af pufferstrømmen og til opretholdelse af kredsløbet, kan som allerede anført være indrettet som en slangepumpe eller også som en stempel- eller turbinepumpe. Fortrinsvis er dens ydelse regulerbar.

Den i fig. 2 skematisk i snit viste detektor består af en gennemløbscelle 1, som fortrinsvis er indrettet med termostat. Den indeholder den egentlige måleindretning 2 samt en opløsningskanal 3, i hvilken måleindretningen, eksempelvis en måleelektrode, en glastrådsoptik eller en temperaturføler, kan sættes ind.

Ved betegnelsen "forstærker V" skal der forstås alle funktionelle dele, som er nødvendige for måleelektrodens arbejde, altså strømkilde, tilslutningsledninger til strømkilden, elektronisk forstærkning o.s.v.

Registreringsinstrumentet G tjener til registrering af måleresultaterne. Der kan anvendes passende instrumenter, men man foretrækker dog en skriver, der kan tilsluttes forstærkeren V. I stedet for skriveren kan også andre analog- eller digital-apparater anvendes. Nødvendigt for målingen er kun registreringen af målesignalet i relation til tidsforløbet.

Den i fig. 3 i snit viste blandeindretning S består af en søjleformet beholder 4, som fortrinsvis har cylindrisk form, og som er lukket for enden og der har en indgangsåbning 5 og i den anden ende en udgangsåbning 6 for pufferopløsningen. Den er fyldt med korn 7, som består af et inert materiale eller af enzym, der er bundet på den faste uopløselige bærer. Søjleens størrelse afhænger af den ønskede blandingsgrad af prøveopløsningen og pufferopløsningen samt, i tilfælde af et bærerbundet enzym, af den ønskede målefølsomhed, af måleprøvemængden og af aktiviteten af enzymet. Bliver der anvendt en søjle med et bærerbundet enzym, foreligger denne fortrinsvis i termostatiseret udførelse. Hensigtsmæssig er søjlen så indrettet således, at den kan udveksles ved simpel fra- og tilskruning, hvis aktiviteten af det bærerbundne enzym er forringet, eller hvis en udskiftning af anden grund er påkrævet. En sådan udskiftning kan eksempelvis være krævet, for at man kan indrette apparatet til bestemmelse af et andet stof og således indføre et andet bærerbundet enzym, eller for at ændre blandingsgraden af prøveopløsningen og pufferopløsningen ved overgang til en anden bestemmelsesmetode.

Prøveapplikatoren A tjener som allerede tidligere beskrevet til en luftblærefri, blokagtig indføring af prøveopløsningen i pufferstrømmen. Den bevirker udmålingen af prøveopløsningen og den stadige opretholdelse af pufferstrømmen uden større hastighedsvariationer.

I den ved fig. 4 viste udførelsesform består applikatoren af et hylster 10 og en deri forskydelig kerne 11. En indgangsledning 12 til puffer-

strømmen fører til boringen 12a i hylsteret 10. En grenledning 13 afgrenses af ledningen 12 og fører til boringen 13a i hylsteret 10. På samme måde fører en afgangsboring 14, som er forbundet med boringen 14a, og som tjener til afgang af pufferopløsningen, ved den anden side af hylsteret 10 videre. En grenledning 15 forbinder afgangsboringen 15a i hylsteret 10 med afgangsledningen 14. En ledning 16, som står i forbindelse med en boring 16a i hylsteret 10, er tilsluttet et vakuum. Den forskydelige kerne har borerne 17, 18 og 19, som ved tilsvarende skyderstilling hver gang kan forbinde borerne 12a og 14a, 13a og 15a samt 16a med boringen 20 og tragtboringen 21 i hylsteret 10.

Ved den i fig. 4a viste normalstilling af kernen 11 bliver der i den tragtformede åbning 21 indhældt den prøveopløsning, der skal undersøges, f. eks. serum, og derfra ind i boringen 18 i kernen 11. Indfyldningshøjden i den tragtformede boring 21 i hylsteret 10 spiller her ingen rolle, når blot boringen 18 i kernen 11 fyldes fuldstændig. Medens prøven indfyldes, flyder pufferstrømmen fra 13a til 15a. Efter afslutning af indfyldningen bliver kernen skubbet i pilretningen, til boringen 18 dækker borerne 12a og 14a. Prøveopløsningen, hvis volumen nøje svarer til boringens volumen 18 i kernen 11, bliver af pufferstrømmen ført blokagtigt til søjlen S. Ved denne stilling af kernen 11 er strømmen fra 13a til 15a afbrudt. Samtidig bliver den i indfyldningsåbningen 21 tilbageblevne opløsningsmængde suget bort gennem boringen 19, boringen 16a og ledningen 16. Så snart prøveopløsningen er ledet bort i pufferstrømmen, bliver kernen 11 skudt imod pilretningen, indtil boringen 18 dækker luftindgangsboringen 20 og afgangsboringen 16a. Boringen 18 bliver derved tømt for puffer og pufferstrømmen igen frigivet af boringen 13a til boringen 15a. Til slut bliver kernen igen bevæget i pilretningen ind til udgangsstillingen, og processen kan gentages.

Applikatorens størrelse, navnlig boringen 18's volumen, afhænger af fremgangsmådens følsomhed, af strømningshastigheden af pufferopløsningen og eventuelt af størrelsen af søjlen S. Såfremt der til boringen 18 ønskes en kapillar diameter, kan der til lettelse af fyldningsprocessen være anbragt en tilsvarende åbning i hylsteret 10

over for indfyldningsåbningen 21. Prøven kan ikke løbe ud, da overfladespændingen af den forneden hængende dråbe hindrer en afrivning.

Applikatoren kan bestå af passende materiale, hvis dette er inert over for de anvendte opløsninger og muliggør et tæt sæde af kernen i hülse. Egnede materialer er f. eks. glas, kunststof og metal. Applikatoren kan også bestå af forskellige materialer, f. eks. af metal med overflader af et glidedygtigt kunststof, f. eks. polytetrafluorethylen.

Applikatoren kan også udformes inden for rammerne af det ovenangivne princip på anden måde, f. eks. cylindrisk, svarende til en flervejshane. Parallelstrømmen bliver i dette tilfælde hensigtsmæssigt styret i en anden hane, hvis kerne sidder på den samme akse som kernen, i hvilken prøveopløsningen applikeres.

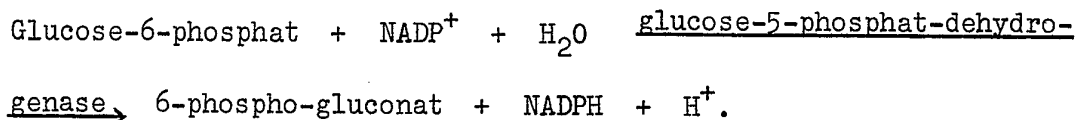
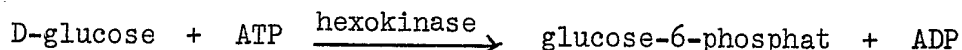
Fremgangsmåden og apparatet ifølge opfindelsen udviser en række særlige fordele. De tillader, at der kan udføres hurtige analyser, da måleresultatet i almindelighed foreligger efter meget kort tid. Ved hjælp af den konstante væskestrøm bliver der tilvejebragt en meget stabil indstilling af systemet, som gør sendrægtige efterjusteringer overflødige, og som garanterer et stadigt driftsberedskab. Anvendelsen af justerede målepipetter bliver overflødig, så at de herved fremkomne fejlmuligheder elimineres. Ved den stadige genanvendelse af de indsatte enzymer bliver der opnået en væsentlig udgiftsbesparing henholdsvis materialebesparing. Ved en simpel ombytning af pufferopløsningen samt eventuelt af det bærerbundne enzym eller dektoren eller begge dele lader fremgangsmåden og apparatet sig hurtigt indrette til en anden bestemmelse.

De følgende eksempler belyser yderligere opfindelsen.

Eksempel 1

Bestemmelse af D-glucose i serum

Princip:



Dannelsen af NADPH måles i fotometer.

Man anvendte det på fig. 1 på tegningen viste apparat. Søjlen S havde en diameter på 1 cm og en fyldehøjde på 1 cm og var fyldt med en 2:1-blanding af i vand kvædet glucose-6-phosphat-dehydrogenase på bærer med den specifikke aktivitet af 27 U/g og hexokinase på bærer med den specifikke aktivitet af 80 U/g.

Som detektor anvendtes et Eppendorf-fotometer med gennemløbscelle 4053.10. Målingen af den optiske tæthed skete ved 366 nm. Til registrering var Eppendorf-kompensationsskriveren tilsluttet.

Den anvendte applikator havde i princippet den på tegningens fig. 4 viste konstruktion. Boringen 18 i kernen 11 havde et volumen på 10 µl. Applikatoren bestod af V4A-stål/teflon.

De enkelte apparatdele var forbundet med silikonslange på 1 mm lysvidde. Som puffer anvendtes der 0,3 M triethanolamin-puffer med pH-værdien 7,5, indeholdende 4 mM magnesiumsulfat, 0,44 mM NADP og 0,59 mM ATP.

I applikatoren blev der med 1 minuts afstand indført serumprøver med bestemt glucoseindhold. Prøven 1 og 4 indeholdt 200 mg glucose/100 ml, prøven 2 og 3 100 mg/100 ml, prøven 5 300 mg/100 ml og prøven 6 og 7 50 mg/100 ml. De på registreringsinstrumentet optegnede målekurver fremgår af fig. 5. De opnåede værdier er angivet på fig. 6 som justeringskurve og viser, at højden af toppen over måleskriverens nullinie er direkte proportional med glucoseindholdet i opløsningen, idet proportionalitetsområdet under de beskrevne forsøgsbetingelser rækker til koncentrationer ind til 200 mg/100 ml. Nulliniens stigning beror på, at det dannede NADPH i pufferen stiger.

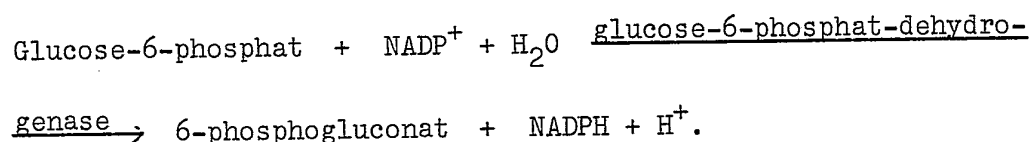
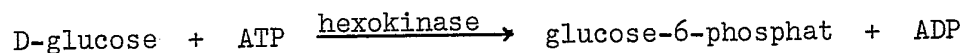
Eksempel 2Bestemmelse af D-glucose i serum

Eksemplet er analogt med eksempel 1 med den forskel, at de reaktionen katalyserende enzymer foreligger i opløsning. Som blanding S (sammenlign fig. 1 på tegningen) blev anvendt en simpel glasspiral, som havde en indre diameter af 2,5 mm og en vejlængde på 70 cm. Pufferen indeholdt som tilsatte komponenter 0,12 mg hexokinase/ml (16,5 U/ml) og 0,12 mg glucose-6-phosphat-dehydrogenase (17 U/ml).

Forsøgsresultatet svarede til det i eksempel 1.

Eksempel 3Bestemmelse af hexokinase i vandig opløsning

Princip:



Dannelsen af NADPH målt i fotometer.

Da reaktionstiden mellem reaktionens begyndelse og målingen i detektoren er konstant, kan der sluttet fra mængden af det dannede NADPH til hexokinasens aktivitet.

Man anvendte det på tegningens fig. 1 viste apparat. Søjlen S havde en diameter på 1 cm og en fyldehøjde på 2 cm og var fyldt med i vand kvældet glucose-6-phosphat-dehydrogenase på en bærer med den specifikke aktivitet på 27 U/g. Mellem detektoren og reservoiret var der indskudt en glasspiral, der havde en indre diameter på 2,5 mm og en vejlængde på 70 cm. Denne glasspiral var opvarmet i et vandbad til

95°C. Den tjente til at inaktivere den før målte hexokinase.

Som detektor anvendtes en Eppendorf-fotometer med gennemløbscelle 4053.10. Målingen af den optiske tæthed skete ved 366 nm. Til registrering var Eppendorf-kompensationsskriveren tilsluttet.

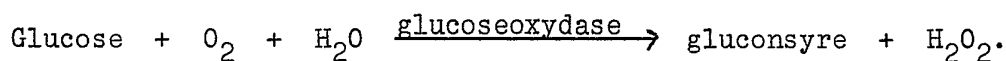
Den anvendte applikator udviste i princippet den på tegningens fig. 4 angivne konstruktion. Boringen 18 i kernen 11 havde et volumen på 10 µl. Applikatoren bestod af V4A-stål/teflon.

De enkelte apparatdele var forbundet med silikonslanger med 1 mm lysvidde. Som puffer anvendtes der 0,3 mM triethanolamin-puffer med pH-værdien 7,5, som indeholdt 4 mM magnesiumsulfat, 0,4 mM NADP, 0,59 mM ATP og 20% glucose.

I applikatoren blev der med en afstand af ca. 1 minut indgivet prøver af vandig hexokinase-opløsning. Der blev indført 1:2 og 1:4 fortyndet hexokinase-opløsning samt ufortyndet hexokinase-opløsning (0,1 mg protein/ml). Justeringskurven på fig. 7 angiver afhængigheden af toppenes højde på registreringskurven af den indsatte hexokinase-koncentration. Man ser, at der er en lineær afhængighed til stede.

Eksempel 4

Bestemmelse af d-glucose i serum ved hjælp af glucoseoxydase ifølge ligningen



Man anvendte det på tegningens fig. 1 viste apparat. Søjlen S havde en diameter på 1 cm og en fyldehøjde på 1 cm og var fyldt med i vand kvældet glucoseoxydase på bærer med en specifik aktivitet på 200 U/g.

Som detektor anvendtes en af firmaet W T W i Weilheim/Obb. forhandlet oxygenfølsom elektrode med et af det samme firma forhandlet oxygenmåleinstrument betegnet Oxi 610 E og den tilsluttede potentiometer-skriver Re 511 fra firmaet Servogor.

Tilstrømningshastigheden ved elektroden var 7,5 cm/sek., og diameteren hos indgangsboringen i gennemløbscellen, som er vist på fig. 2, var 1 mm.

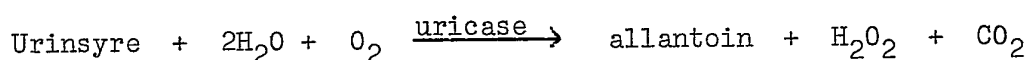
Den anvendte applikator havde i princippet den på tegningens fig. 4 viste konstruktion. Boringen 18 i kernen 11 havde en diameter på 2 mm og 10 mm's længde. Applikatoren bestod af glas.

De enkelte apparatdele var forbundet med silikonslanger med 1 mm's diameter. Som puffer anvendtes 0,2 M kaliumphosphatpuffer med pH-værdien 6,0 indeholdende 18 mM kaliumjodid, 7,5 mM ammoniumheptamolybdat og 800 mM natriumchlorid.

I applikatoren blev der med en afstand af ca. 1 minut indgivet serumprøver med et bestemt glucoseindhold. Prøverne 1 til 3 indeholdt hver 100 mg glucose/100 ml serum. Prøven 4 indeholdt 200, prøven 5 300, prøven 6 400 og prøven 7 500 mg/100 ml. De på registreringsinstrumentet optegnede målekurver fremgår af fig. 8. De opnåede værdier er angivet i fig. 9 som justeringskurve og viser, at højden af toppene over måleskriverens nullinie er direkte proportional med glucoseindholdet i prøven.

Eksempel 5

Bestemmelse af urinsyre ved hjælp af uricase efter ligningen:



Fremgangsmåden i eksempel 1 benyttedes under anvendelse af det samme apparat til bestemmelse af urinsyre. Søjlen S var fyldt med uricase på bærer. Søjlen S havde en diameter på 1 cm og en fyldehøjde på 5 cm. Den specifikke aktivitet af den bærerbundne uricase var 3 U/g.

Man anvendte det i eksempel 1 beskrevne apparat. Tilstrømningshastigheden ved elektroden var 3,5 cm/sek., diameteren af indgangsboringen i gennemløbscellen, som er vist på fig. 2, var 1 mm.

Den anvendte applikator havde i princippet den på tegningen viste

konstruktion. Boringen 18 i kernen 11 havde en diameter på 2,5 mm og en længde på 13 mm. Applikatoren bestod af glas.

De enkelte apparatdele var forbundet med silikonslanger på 1 mm's diameter. Som puffer anvendtes 0,2 M boratpuffer, pH-værdi 6,5, i hvilken 600 U/ml katalase var opløst.

I applikatoren blev der med en afstand af ca. 6 minutter indgivet prøver af urinsyreopløsningen med et bestemt indhold. Prøve 1 indeholdt 5 mg urinsyre/100 ml, prøve 2 10 mg, prøve 3 15 mg, prøve 4 30 mg, prøve 5 45 mg og prøve 6 60 mg/100 ml.

Den på registreringsinstrumentet optegnede målekurve er vist på tegningens fig. 10. De erholdte værdier er angivet ved fig. 11 som justeringskurve. Man ser, at toppenes højde over måleskriverens nul-linie er direkte proportional med urinsyreindholdet i prøven.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af enzymatisk reagerende stoffer i vandig opløsning ved omsætning i nærværelse af mindst ét enzym, ved hvilken en vandig opløsning af det stof, der skal bestemmes, indføres i en med konstant hastighed cirkulerende pufferopløsning, der indeholder de for omsætningen nødvendige reagenser, idet opløsningen bringes i kontakt med enzymet, hvorefter den ledes over en detektor, der måler den ved omsætningen fremkaldte forandring i opløsningen, og pufferopløsningen tilbageføres i kredsløbet, idet de forbrugte reagenser eventuelt regenereres, k e n d e t e g n e t ved, at en bestemt mængde af opløsningen af det stof, der skal bestemmes, indgives luftblærefrit i pufferopløsningen som en blok uden ændring af strømnings-hastigheden.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pufferopløsningen opdeles i to delstrømme, at delstrømmene afvekslende afbrydes, og at en bestemt mængde af opløsningen, der indeholder det stof, som skal bestemmes, indføres i en delstrøm, medens denne er afbrudt.

3. Apparat til udførelse af fremgangsmåden ifølge krav 1 og 2, k e n d e t e g n e t ved et pufferreservoir, en prøveapplikator med i det mindste to ved en spærreskyder med mindst to korresponderende borerer afvekslende spærrebare gennemløb, idet den ene af borererne står i forbindelse med en tilløbsledning for opløsningen af det stof, der skal bestemmes, når dets tilsvarende gennemløb er spærret, en blandeindretning og en detektor med registreringsinstrument samt pumpe med konstant ydelse, som er indbyrdes forbundne med rørledninger til et kredsløbs-system.

4. Apparat ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at applikatoren består af et hylster med forskydelig kerne, og at hylster og kerne hver har tre gennemløb, som ved kernens forskydning kan bringes til dækning.

5. Apparat ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at applikatoren har et hylster (10) med indløbsboringer (12a, 13a), udløbsboringer (14a, 15a), luftindføringsboring (20), en tragtformet boring (21) for indfyldning af prøven og vakuumboring (16a) samt en i hylsteret (10) forskydelig kerne (11) med borerer (17, 18, 19), som er således anbragte, at ved forskydning af kernen (11), borererne (13a, 17 og 15a) henholdsvis (12a, 18 og 14a) henholdsvis (20, 18 og 16a) henholdsvis (21, 19 og 16a) samt (21 og 18) kan forbindes således, at ledningen, der dannes af borererne (13a, 17, 15a) er lukket, når ledningen, der dannes af borererne (12a, 18, 14a), er åben.

Fremdragne publikationer:

GB patent nr. 1118769

SE fremlæggelsesskrifter nr. 319921, 355415

US patent nr. 3512517

Febs Letters, bind 9, nr. 1, 1970.

Fig. 1

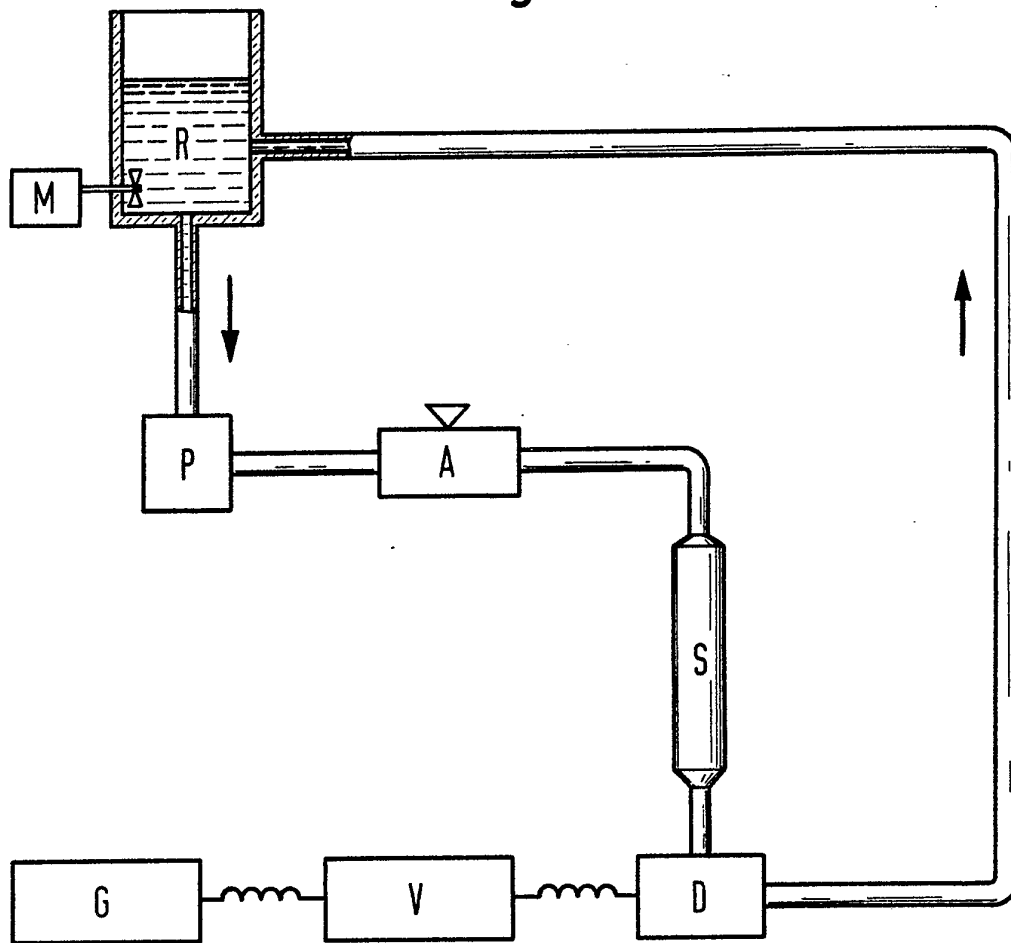


Fig. 2

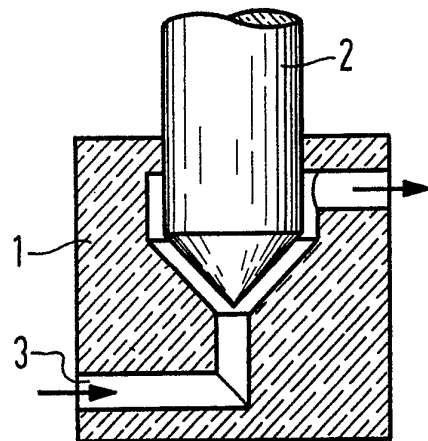


Fig. 3

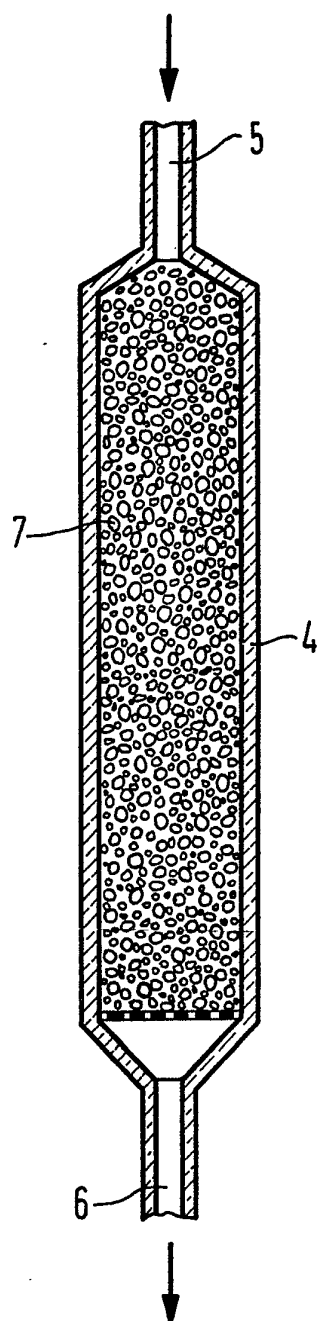


Fig. 4

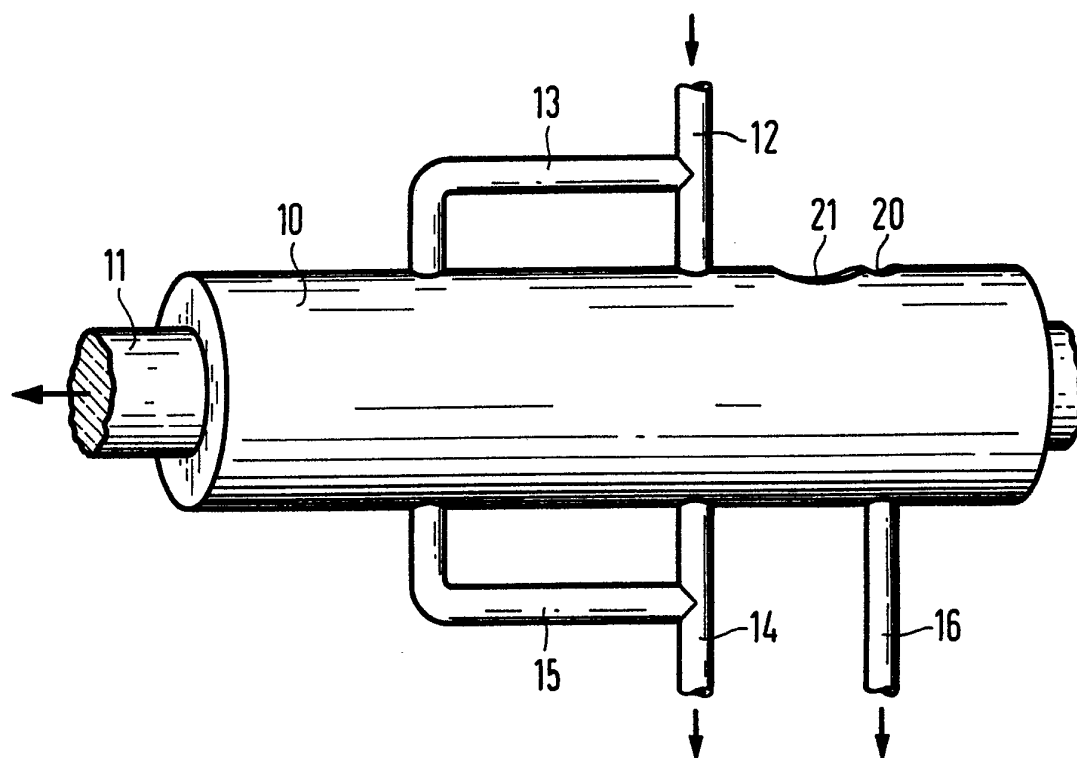


Fig. 4a

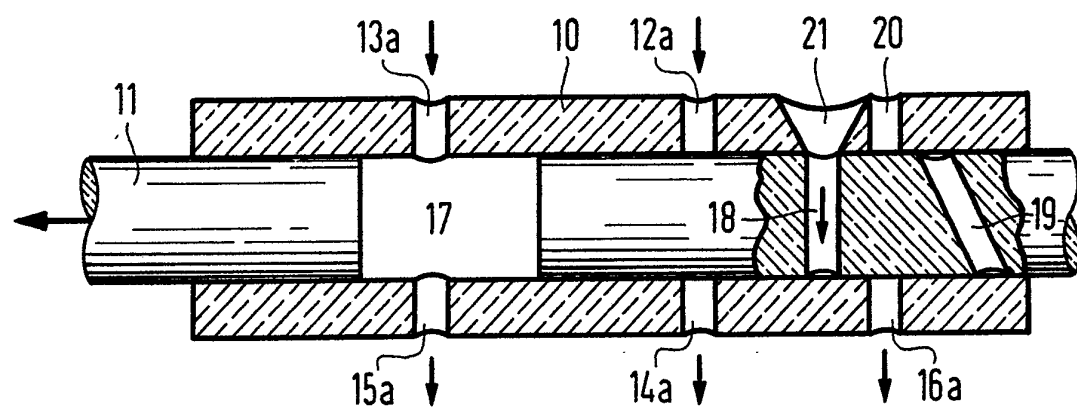


Fig. 5

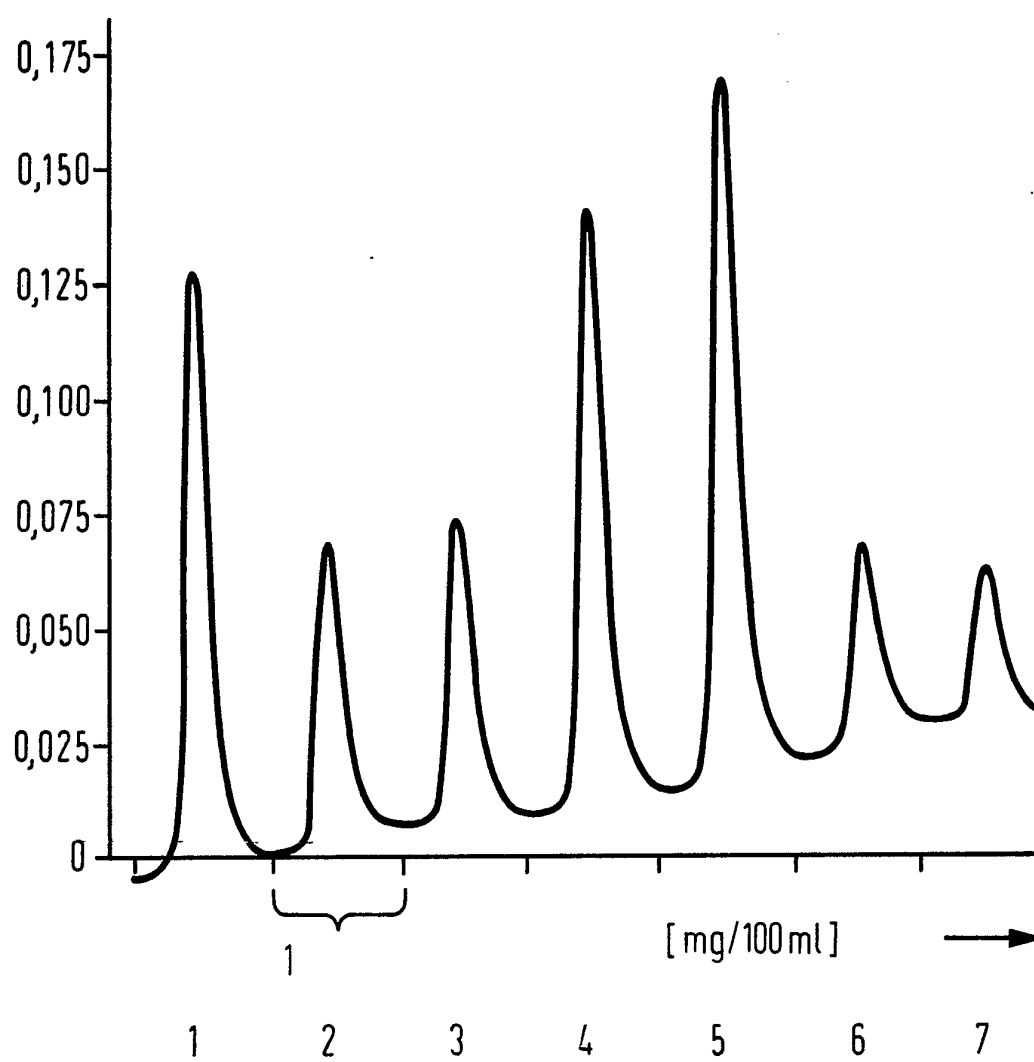


Fig. 6

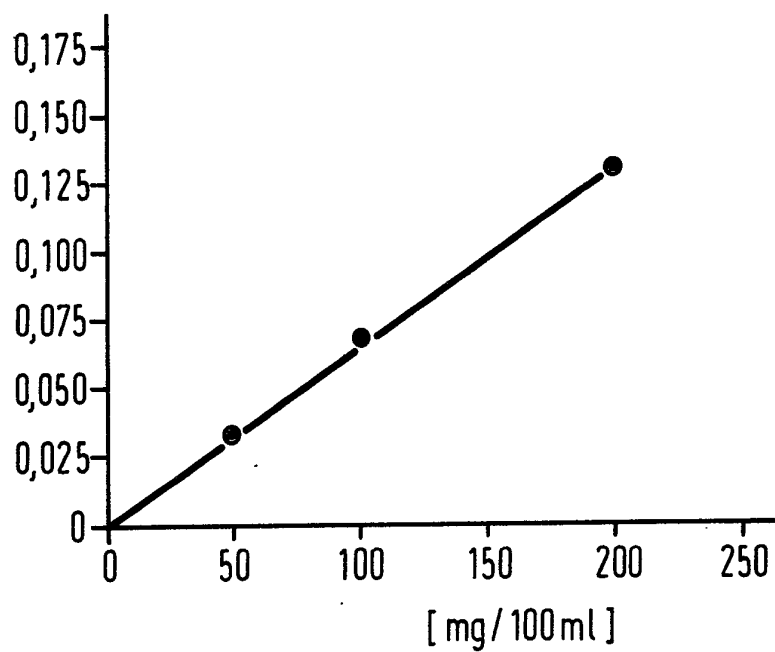


Fig. 7

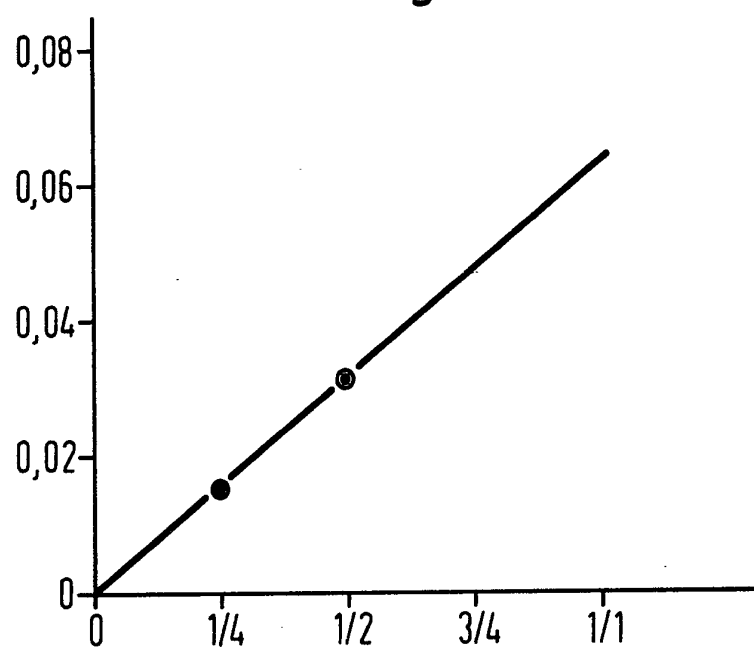
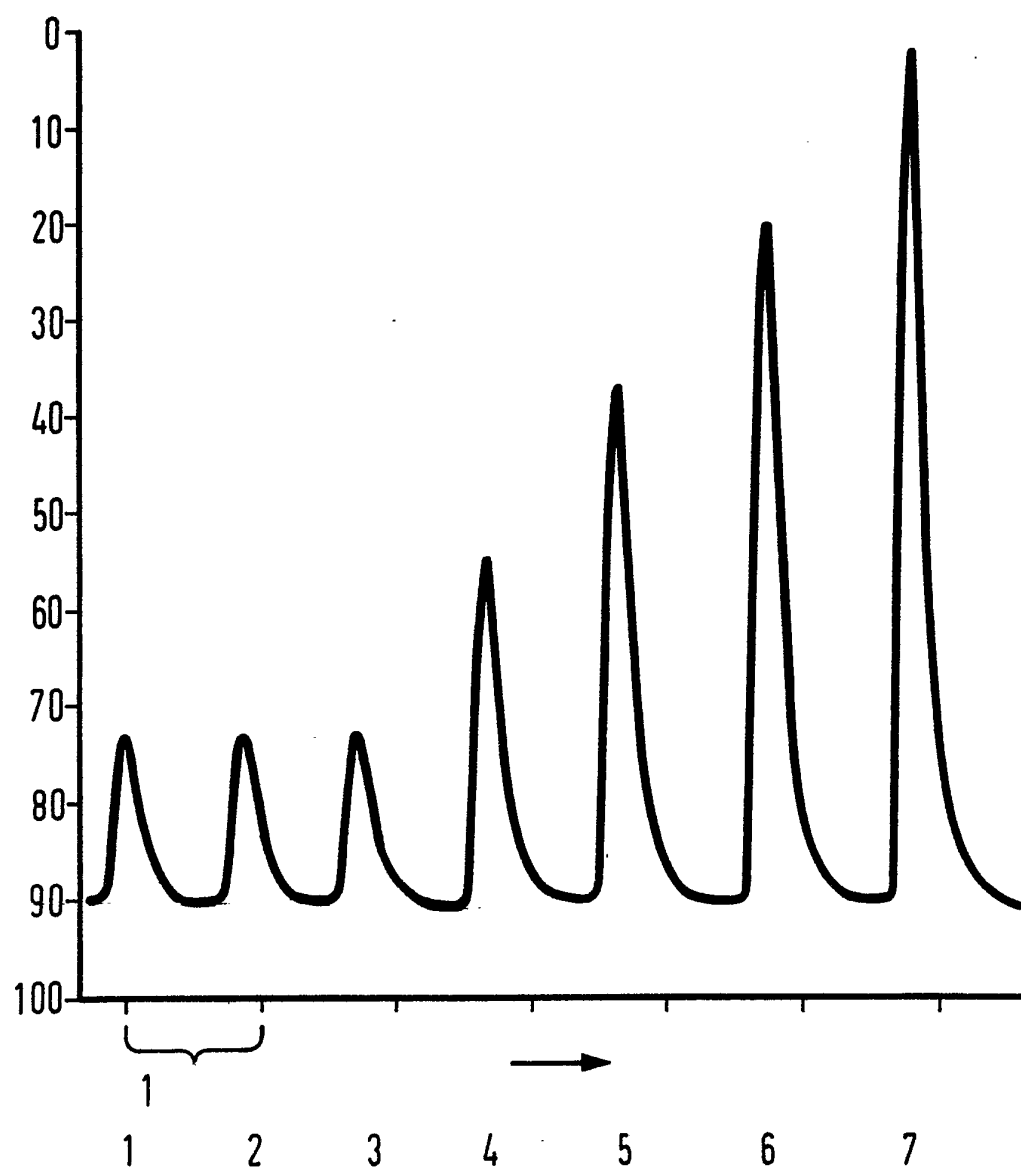


Fig. 8



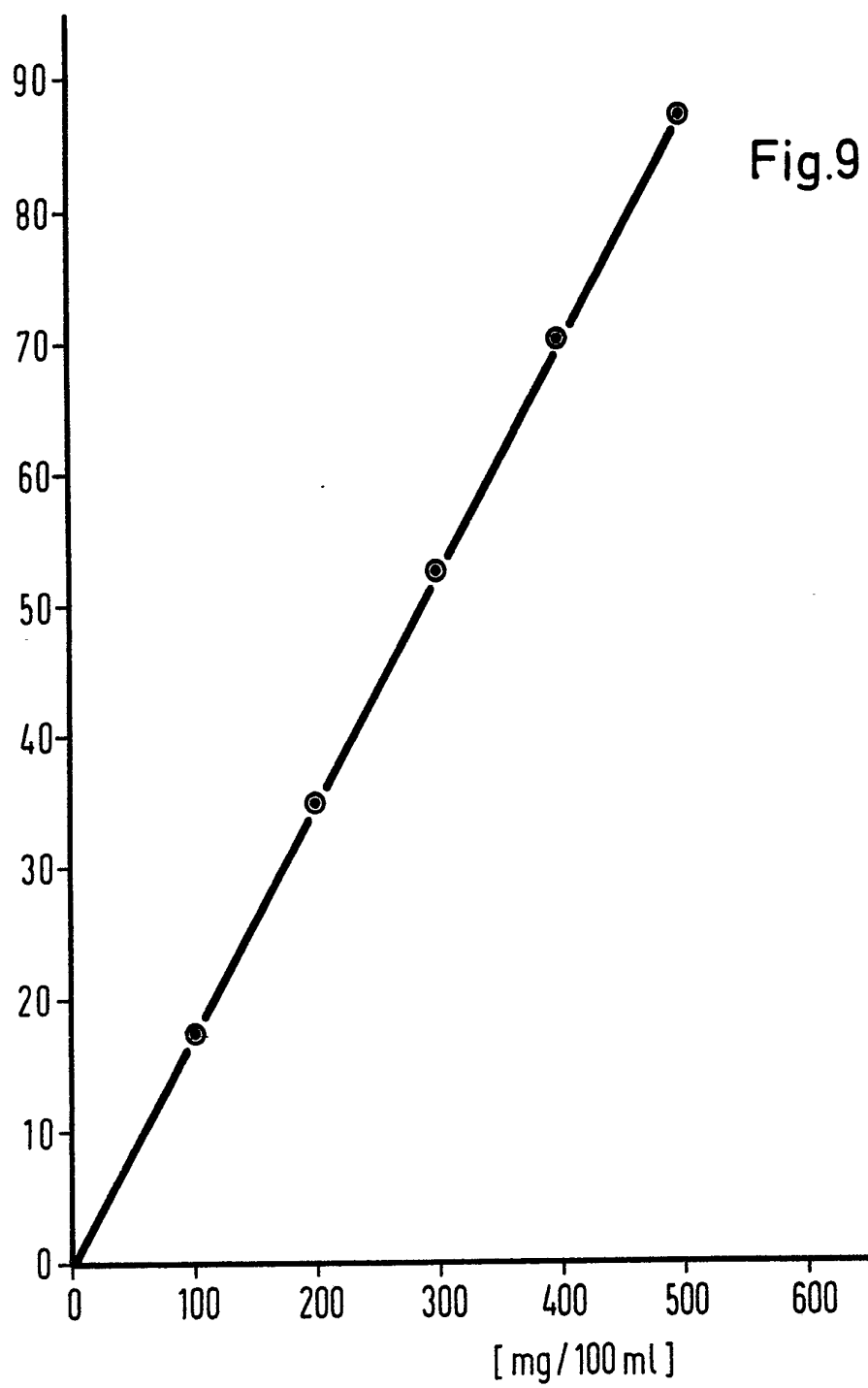


Fig.10

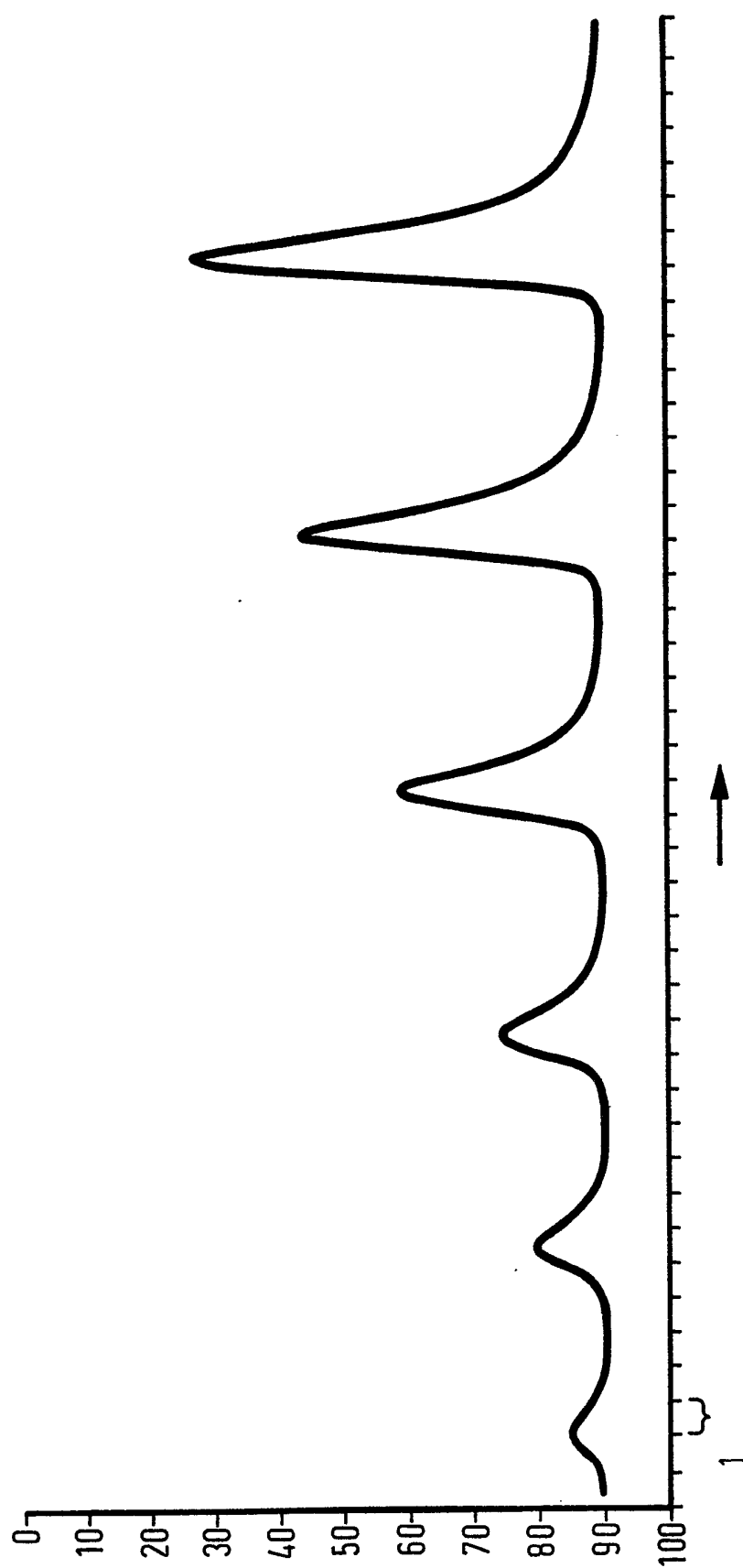


Fig.11

