



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 08.05.75 (P. 180253)

Pierwszeństwo: 10.05.74 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 05.06.76

Opis patentowy opublikowano: 30.08.1978

MKP B011 11/00

Int. Cl.² B01L 11/00

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Union Carbide Corporation, Nowy Jork
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Urządzenie do przeprowadzania analizy wielu próbek płynu

1

Przedmiotem wynalazku jest urządzenie do przeprowadzania analizy wielu próbek płynu a zwłaszcza określania ilości dowolnej substancji w próbce płynu, na przykład serum przez poddawanie reakcji próbki płynu z jednym lub większą ilością reagentów oraz odśrodkowe rozdzielanie składników poreakcyjnych dla dokładnego określenia ilości danej substancji.

W czasie prowadzenia analizy płynów, na przykład serum, często ważną sprawą jest określenie w próbce płynu ilości substancji takich jak hormony tarczycowe, hormony płciowe, glikozydy sercowe, witaminy i antygeny rakowe. Ponadto wyjątkowo ważną sprawą jest określenie ilości tego typu substancji w sposób dokładny i szybki.

Znane rozwiązania służące do prowadzenia analizy płynu są bardzo pracochłonne, ponieważ polegają na pojedynczych operacjach mieszania, poddawania reakcji, rozdzielania i pomiaru i dotychczas nie są znane urządzenia do prowadzenia analizy wielu próbek płynu, umożliwiające szybkie i dokładne określenie ilości dowolnych substancji w płynach.

Przedmiotem wynalazku jest urządzenie, w którym prowadzenie analizy wielu próbek płynu polega na tym, że w wielu pojemnikach poddaje się reakcji co najmniej dwie ciecz, dla wytworzenia cieczy zawierającej co najmniej jeden produkt reakcji, po czym z tymi pojemnikami łączy się separatory ciekłej fazy, poddaje się pojemniki i separatory ciekłej fazy działaniu siły odśrodkowej, wystarczającej do przemieszczenia ciekłej zawartości pojemników do połączonych z nimi separatorami ciekłej fazy oraz do zapewnienia podziału cieczy dopływającej do nich na co najmniej dwie fazy,

2

po czym mierzy się co najmniej jedną własność oddzielonej fazy.

Urządzenie według wynalazku do przeprowadzania analizy wielu próbek płynu, zawiera obrotowy człon podtrzymujący mający wiele kołowo rozmieszczonych pojemników, w których znajduje się ciecz i wiele kołowo rozmieszczonych pojemników, w których znajduje się druga ciecz oraz wiele separatorów ciekłej fazy w kołowym układzie przy czym pojemniki jednej i drugiej cieczy oraz separatory ciekłej fazy są ustawione współśrodkowo wokół wspólnej osi. Separatory ciekłej fazy są tandemowo połączone z pojemnikami drugiej cieczy poddawanej reakcji, które to pojemniki są z kolei połączone tandemowo z pojemnikami pierwszej cieczy, przy czym z separatorem ciekłej fazy jest połączony zbiornik na ciecz oddzieloną przez ten separator.

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony w przykładach wykonania na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia przyrząd do przeprowadzania analizy w widoku z boku z częściowym przekrojem, fig. 2 — część przyrządu z fig. 1 w widoku z góry, fig. 2a — fragment przyrządu pokazanego na fig. 2 w widoku perspektywicznym, fig. 3 — schemat układu pomiarowego, fig. 4 — wykres stosowany jako wzorzec odniesienia, fig. 5a, 5b, 5c przedstawiają schematycznie działanie separatorów ciekłej fazy w szczególnym przykładzie wykonania, fig. 6 i 6a — inny przykład wykonania przyrządu we fragmentarycznym widoku z góry i w pionowym przekroju.

Urządzenie według wynalazku zawiera obrotowy utrzymujący człon 15, który przymocowany jest do wału 20 napędzanego silnikiem 30 o określonym zakresie prędkości,

który to silnik sprzężony jest z wałem 20 w miejscu 18. Wszystkie wymienione wyżej elementy oparte są na podstawowej płycie 40 i otoczone są obudową 50, na której znajduje się zdejmowana pokrywa 60. Do obrotowego członu 15 w odłączalny sposób przymocowany jest pierścień 70, który utrzymuje wiele odejmowanych rurek 65, które są łączone z pierścieniem 70 za pomocą połączeń 80 z kulowymi gniazdami tak, że rurki 65 mają swobodę poruszania się od spoczynkowego położenia 90 do obrotowego położenia 100 po odpowiednim obrocie członu 15. Na członie 15 jest zamocowana odejmownie za pomocą trzpieni 112 tarcza 110, której każdy rząd 120 promieniowo usytuowanych pojemników 130 i 140 jest ustawiony zasadniczo w jednej linii z rurką 65. Rurki 65 są nieco przesunięte od dokładnego promieniowego ustawienia naprzeciwko pojemników 130 i 140 dla skompensowania siły bezwładności cieczy podczas jej przepływu do rurek 65 i dla danego przyrządu przedstawienie to w prosty sposób może być określone i zrealizowane.

Dla uzyskania danej zawartości substancji w próbkach surowicy lub podobnego płynu, dokładnie odważoną ilość reagenta 150 umieszcza się w pojemnikach 130 a dokładnie odważoną ilość serum w formie próbki 160 wlewa się do pojemników 140, przy czym reagent musi reagować z substancją w próbce, której określona ilość powoduje wytworzenie fizycznie oddzielanego produktu reakcji. Tak więc pojemniki 130 i 140 mogą być wypełniane ręcznie za pomocą pipety lub za pomocą odpowiedniego przyrządu. Zwiększa się prędkość obrotową silnika 30 do pierwszej prędkości, przy której siła odśrodkowa powoduje przedostawanie się reagenta 150 z pojemników 130 do pojemników 140 oraz mieszanie się i reagowanie z próbkami 160 w pojemnikach 140. Prędkość obrotowa silnika 30 jest regulowana w ten sposób, że zawartość pojemników 140 nie jest z nich wypychana na skutek działania siły odśrodkowej. Reagent 150 i próbki 160 reagują ze sobą w pojemnikach 140 i z czasem zwiększa się ilość produktu reakcji w tych pojemnikach oraz powstają w końcu warunki równowagi. Po tym okresie czasu można wykonywać analizę zawartości pojemników 140 dla określenia znany sposób ilości określonej substancji w próbkach 160. Tego typu czynności w najlepszym przypadku są nudne i wymagają długiego okresu czasu, do godziny lub dłużej. Jednakże w urządzeniu według wynalazku nie ma potrzeby doprowadzania reakcji w pojemnikach 140 do stanu równowagi lecz wystarczy tylko uzyskać dającą się zmierzyć ilość produktu reakcji albo zmianę ilości reagentu w pojemnikach 140, po czym zwiększa się prędkość obrotową silnika 30 do takiej, przy której zawartość pojemników 140 na skutek działania siły odśrodkowej przedostaje się poprzez kanały 700 do separatorów 190 do oddzielania ciekłej fazy, pokazanych na rysunku w postaci chromatograficznych żelowych kolumn 200 umieszczonych w otwartych szklanych osłonach 210, które są umieszczone w rurkach 65 z możliwością ich wyjmowania. Ciekły materiał stykający się z żelowymi kolumnami 200 jest chromatograficznie oddzielony po zastosowaniu cieczy wymywającej, przez dozowanie strumienia odpowiedniej cieczy, na przykład roztworu buforowego, ze zbiornika 222 poprzez pompę 220 cieczy wymywającej, dalej przez przewód 230 oraz dozownik 240 do pojemników 130 zaraz po przemieszczeniu zawartości 160 pojemników 140 do żelowych kolumn 200.

Pokazana na fig. 1 pompa 220 jest uruchamiana za pomocą znanego układu 212 przekładnika czasowego w dogodnym okresie czasu, na przykład w ciągu 15 sekund, po osiągnięciu zwiększonej drugiej prędkości. Pompa 220

zapewnia ustalone natężenie przepływu cieczy wymywającej w ciągu ustalonego okresu czasu i całkowita ilość cieczy wymywającej jest automatycznie dzielona do pojemników 130. Ciecz wymywająca przepływa do żelowych kolumn 200 poprzez pojemniki 130 i 140 na skutek działania siły odśrodkowej. Po dotarciu cieczy wymywającej do żelowych kolumn 200 siła odśrodkowa powoduje chromatograficzne rozdzielanie składników cieczy, która przepłynęła z pojemników 140.

Przy odpowiednim dobraniu żelowej kolumny 200 oraz według poniżej opisanej procedury, poreakcyjny składnik w materiale w żelowej kolumnie jest szybko oddzielany przez wymywanie i jest przemieszczany poprzez wyloty 215 osłony 210 do rurek 65, na skutek działania siły odśrodkowej. W przypadku zastosowania radioaktywnego reagenta każda rurka 65 jest zdejmowana z pierścienia 70 a radioaktywność jej zawartości 152 mierzy się stosując układ pokazany na fig. 3, zawierający detektor 230 promieniowania gamma, na przykład kombinację powielacza fotoelektrycznego z kryształami jodku sodowego, wzmacniacz 240, analizator 245 amplitudy impulsów, licznik 250 oraz urządzenie obrazujące 260, na przykład drukarkę cyfrową. W ten sposób uzyskana liczba impulsów dla każdej rurki 65 może być odniesiona do zawartości danej substancji w próbce za pomocą obliczania lub porównywania z wzorcem.

Jak pokazano w szczególnym przykładzie wykonania na fig. 2a pojemnik 130 wewnętrznego rzędu jest połączony z pojemnikiem 140 zewnętrznego rzędu, z którym jest usytuowany w jednej linii dzięki korytkowemu przejściu 500, które jest utworzone przez boczne powierzchnie oraz wznoszącą się dolną powierzchnię wewnętrznego pojemnika 130. Przy dostatecznej prędkości obrotowej i co za tym idzie sile odśrodkowej ciecz z pojemnika 130 przelewa się poprzez podwyższoną część 800 do usytuowanego w jednej linii z nim zewnętrznego pojemnika 140. Także pojemnik 140 zewnętrznego rzędu jest połączony z separatorem 190 fazy ciekłej, który jest ustawiony w jednej linii z pojemnikiem 140, za pomocą korytkowego przejścia 600, które jest utworzone przez boczne powierzchnie i wznoszącą się dolną powierzchnię zewnętrznego pojemnika 140 oraz przez kanał 700. Przy dostatecznej prędkości obrotowej i co za tym idzie sile odśrodkowej ciecz z zewnętrznego pojemnika 140 przepływa do ustawionego w jednej linii separatora. Jednakże pochylenie 145 zewnętrznych pojemników 140 jest bardziej strome od pochylenia 147 wewnętrznych pojemników 130 tak, że ciecz jest utrzymywana w zewnętrznym wgłębieniu 140 na skutek działania podwyższonej części 600 tworzącej zaporę aż do zwiększenia siły odśrodkowej do wielkości większej od wymaganej do istnienia przepływu cieczy z wewnętrznego pojemnika 130 do zewnętrznego pojemnika 140.

Według wynalazku jak opisano powyżej dla danej reakcji i dla danych konkretnych ilości reagentów teoretycznie możliwe jest obliczenie koncentracji produktu reakcji lub reagenta w dowolnym określonym okresie czasu po rozpoczęciu reakcji i uzyskanie wykresu zależności koncentracji od czasu, w stosunku do której mogą być porównywane koncentracje mierzone w konkretnych okresach czasu.

Dla prostego przypadku procedura jest następująca. Dla hipotetycznej, dwucząsteczkowej, nieodwracalnej reakcji $A + B \longrightarrow C$, gdzie równe ilości A i B mieszają się w czasie $t = 0$ oraz przy $t = 0$ stężenia $C = 0$, okazuje się, że stężenie w dowolnym momencie po czasie t określone jest wzorem:

$$C = \frac{A_0^2 K_1 t}{1 + A_0 K_1 t}$$

gdzie: A_0 oznacza początkowe stężenie reagentów A i B, $K_1 = A \cdot (-E_a/RT)$ — równanie Arrheniusa, w którym A oznacza współczynnik częstotliwości, E_a — energię aktywacji, T — temperaturę reakcji i R — uniwersalną stałą gazową.

Przy pomocy tego wzoru i wynikającego z niego wykresu dla danej reakcji stężenie zmierzone po upływie stosunkowo krótkiego czasu reakcji może być przekształcone w całkowite stężenie lub ilość danej substancji.

W szczególnym przykładzie wykonania wynalazku zastosowano wzorzec, dzięki któremu unika się niedogodności powyżej opisanych prób. W rozwiązaniu tym (fig. 1 i 2) ogólnie umieszcza się przeciwciało jako reagent w wewnętrznych pojemnikach 130 tarczy 110 a próbki serum zawierające nieznaną ilość dowolnej substancji, na przykład tyroksynę (T-4) razem z radioaktywnym odczynnikiem T-4 oraz odczynnikami podstawieniowym umieszcza się w zewnętrznych pojemnikach 140. Zwiększa się gwałtownie prędkość obrotową tarczy 110 do pierwszej prędkości, podczas której przeciwciało z wewnętrznych pojemników 130 jest wypychane przez siłę odśrodkową od zewnętrznych pojemników 140, gdzie przeciwciało i T-4 mieszają się i reagują ze sobą.

Podczas reakcji, T-4 w próbkach serum jest przemieszczane do jego nośnika i ma możliwość kontynuowania z radioznaczym T-4 dla ograniczonej liczby miejsc połączeń w reagencie przeciwciałowym.

W dowolnym momencie po zmieszaniu i podczas reakcji w pojemnikach 140 stosunek radioznakowego T-4 w pojemnikach 140 określa pomiar początkowej ilości T-4 w próbkach serum. Tak więc reakcja przebiega przy początkowej prędkości w ciągu krótkiego okresu czasu wystarczającego dla zapewnienia widocznych radioaktywnych sygnałów i dużo wcześniej przed osiągnięciem równowagi reakcji zwiększa się prędkość obrotową tarczy 110 do większej wartości, przy której zawartości zewnętrznych pojemników 140 są wyrzucane przez siłę odśrodkową do połączonych z nimi separatorów, przez które przechodzi kompleks przeciwciała T-4, zawierający radioaktywny i nieradioaktywny T-4, wraz z nieprzereagowanym przeciwciałem, przy czym niekompleksowy T-4, radioaktywny i nieradioaktywny jest absorbowany w separatorach. Czyżby ta wstrzymuje reakcję tworzenia kompleksów przez usuwanie co najmniej jednego reagenta, przeciwciała, ze strefy reakcji, którą stanowią żelowe kolumny 200 i w konsekwencji wskaźnik radioaktywności oddzielnego kompleksu T-4 przeciwciała w porównaniu z wzorcem daje pomiar początkowej zawartości T-4 w badanej próbce. Wzorzec może być określony przez stosowanie serum lub materiału podobnego do serum o znanym lecz innym T-4 i stosując te same warunki reakcji co w przypadku badanych próbek oraz rysując wykres wskaźników radioaktywności lub stosunki wskaźników uzyskanych dla każdego materiału w zależności od znanego w nim poziomu T-4. Korzystnie wzorcowe materiały umieszcza się w odpowiednich pojemnikach 140 tej samej tarczy 110 stosowanej do badanych próbek o nieznanej ilości T-4 i wzorcowe dane oraz badane dane uzyskuje się równocześnie.

Fig. 4 bezpośrednio dotyczy konkretnego przykładu opisanego poniżej i przedstawia wzorcowy wykres uzyskany dla stosowania w powyżej opisany sposób i ukazuje wskaźniki radioaktywności na minutę, uzyskane przy zastosowaniu

6

wzorcowych początkowych materiałów o znanej ilości T-4. Dla przykładu fig. 4 wskazuje dla zastosowanych konkretnych warunków, że gdy wskaźnik 4000 uzyskuje się z próbki serum badanej jednocześnie z wzorcowymi materiałami, wówczas początkowa ilość T-4 w próbce serum wynosi 6,2 mikrogramów T-4 na 100 ml próbki. Oczywiście jest sprawą, że według wynalazku używa się odpowiednich i dokładnie kontrolowanych ilości reagentów a wynalazek ogólnie stosuje się do wszystkich reakcji ciecz-ciecz, zwłaszcza stosowanych w znanych metodach klinicznej analizy serum krwi lub materiałów podobnych do serum stosując znane odczynniki.

Wynalazek nadaje się do stosowania zwłaszcza do analizy szerokiego zakresu ważnych fizjologicznie cząsteczek, na przykład jak opisano w Clinical Chemistry, tom 19, nr 2 1973, artykuł D. S. Kelley, L. P. Brown i P.K. Beach na stronie 146.

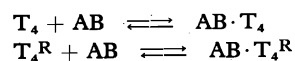
Przedstawiony przykład dokładnie ilustruje przedmiot wynalazku.

Przykład. Kliniczne próbki serum poddano analizie dla określenia ilości zawartej w nich tyroksyny (T-4) stosując przyrząd pokazany na fig. 1, 2 i 3 oraz wzorcową krzywą pokazaną na fig. 4. Jednocześnie badano dwie grupy po dziewięć klinicznych próbek serum o nieznanej ilości T-4 oraz dwie grupy po pięć wzorcowych roztworów, z których każdy ma inną lecz znaną ilość T-4. Analizę realizowano w ten sposób, że każde dwa zewnętrzne pojemniki 140 tarczy 110 wypełniono 35 mikrolitrami konkretnej klinicznej próbki serum. Tak wypełniono osiemnaście zewnętrznych wgłębień oznaczonych na fig. 2 odnośnikami 1, 1', 2, 2', 3, 3', 9 9'. Także każde dwa zewnętrzne pojemniki 140 tarczy 110 wypełniono 35 mikrolitrami konkretnego jednego z pięciu wzorcowych roztworów. Tak wypełniono dziesięć zewnętrznych pojemników 140 oznaczonych na fig. 2 przez odnośniki a, a', b, b', e, e'. Ilości T-4 we wzorcowych roztworach wytworzonych w poniżej opisany sposób podano w tablicy 1.

Tablica 1

Wzorzec	T-4 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$
a	0
b	2
c	6
d	12
e	30

W czasie napełniania zewnętrznych pojemników 140 w opisany powyżej sposób każdą 35 mikrolitrową ilość mieszano z 65 mikrolitrami destylowanej wody. Dodatkowo do każdego zewnętrznego pojemnika 140 wypełnionego w wyżej opisany sposób dodawano 50 mikrolitrów roztworu radioaktywnego T-4-125I, którego sposób jego wytwarzania opisano poniżej. Każde wewnętrzne wgłębienie 10, 10', 90, 90' i A, A' E, E' napełniono odczynnikiem przeciwciała (opisanym poniżej). Prędkość obrotową tarczy 110 w przyrządzie gwałtownie zwiększono do pierwszej prędkości takiej, przy której zawartości wewnętrznych wgłębień 10, 10', 90, 90' i A, A', E, E' w ciągu 3 sekund są przemieszczane na skutek działania siły odśrodkowej do odpowiednich połączonych z nimi zewnętrznych wgłębień 1, 1', 9, 9' i a, a', e, e', w których rozpoczyna się następująca reakcja trwająca trzydzieści minut.



Po upływie trzydziestu minut prędkość obrotowa tarczy 110 gwałtownie zwiększa się do drugiej prędkości a działająca siła odśrodkowa powoduje przemieszczanie zawartości wgłębień 1, 1', ... 9, 9' i a, a', ... e, e' do odpowiednich połączonych z nimi chromatograficznych kolumn 200. Piętnaście sekund po zwiększeniu prędkości tarczy 110 do drugiej prędkości pompa 220 płynu wymywającego została uruchomiona za pomocą znanego układu przekaźnika czasowego 212 dla dozowania 2 mililitrów roztworu buforowego, opisanego poniżej, ze zbiornika 222 do każdego z wewnętrznych pojemników 130 za pomocą dozownika 240. Całkowity przepływ 60 ml zapewniono dozując 30 ml na minutę w ciągu dwóch minut. Był on rozdzielany do trzydziestu pojemników po 2 ml na każde wgłębienie. W ten sposób wprowadzony za pomocą dozownika 240 roztwór na skutek działania siły odśrodkowej był przemieszczany z wgłębień 10, 10', ... 90, 90' i A, A', ... E, E' do 1, 1' ... 9, 9' i a, a', ... e, e' do odpowiednich chromatograficznych kolumn 200, w których reagenty i produkty reakcji poddawano wymywaniu na skutek działania siły odśrodkowej na płyn wymywający. W następstwie kompleks przeciwiał T-4, zawierający zarówno radioaktywny jak i nieradioaktywny T-4, wraz z nieprzereagowanym przeciwciałem zostały szybko wymyte na przykład w ciągu 1 minuty, z pojedynczych chromatograficznych kolumn 200 i na skutek działania siły odśrodkowej były wtłaczane do rurek 65 jak pokazano odnośnikami 152 na fig. 1 i 2. Nieprzereagowany roztwór T-4¹²⁵I i składniki serum o małej masie cząsteczkowej pozostały w chromatograficznych kolumnach 200. W przykładzie tym po oddzieleniu przeciwciała za pomocą wymywania, powyżej podaną reakcję zasadniczo należy kończyć w czasie oddzielania w każdej z chromatograficznych kolumn 200. W dowolnym momencie po wymyciu, rurki 65 sprowadza się do układu pokazanego na fig. 3 a zawartość 152 każdej rurki 65 jest mierzona w ciągu 1 minuty jak pokazano w tablicy 2.

Tablica 2

Rurka odpowiadająca położeniu	Jednostki na min.	T4 w % µg
1	2	3
a 0	7625	0
a' 0'	7468	0 wzorcowe ilości
b 1	5398	2 naniesione na wy-
b' 1'	5496	2 kresie na fig. 4
c 2	3194	6 wzorcowe ilości
c' 2'	3307	6 naniesione na wy-
d 3	2235	12 kresie na fig. 4
a' 3'	2325	12
e 4	1299	30
e' 4'	1336	30
1 5	4544	4,7
1' 5'	4408	5,1
2 6	3009	8,9
2' 6'	2956	9,0 Ilość w nieznanych
3 7	3919	6,4 klinicznych próbkach
3' 7'	4051	6,1 określone z wykresu
4 8	4092	6,0 na fig. 4
4' 8'	3899	6,4
5 9	3415	7,7
5' 5'	3627	7,1
6 10	4500	4,8

1	2	3
6' 10'	4389	5,2
7 11	4092	6,0
7' 11'	3899	6,4
8 12	3225	8,4
8' 12'	3192	8,2
9 12	3501	7,4
9' 13'	4052	6,0

Znane ilości T-4 w µg T-4 na 100 ml próbki wzorców a, a', ... e, e' zostały naniesione na wykres względem uzyskanych sygnałów na minutę dla sporządzenia wykresu pokazanego na fig. 4 stosując zmierzone ilości jednostek w tablicy 2 odpowiadające próbkom. Określone w tablicy 2 ilości dla klinicznych próbek otrzymano z wykresu pokazanego na fig. 4.

Poniżej przedstawiono szczegółowy opis materiałów i procedury opisanego powyżej przykładu. Analizie poddawano kliniczne próbki serum. Zastosowano następujące materiały: tyroksynę (T-4 surowiec), wolny kwas kat. nr 2376 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo; tyroksynę ¹²⁵I (T-4¹²⁵) kat. nr 6751 „Tetramet — 125”, Abbott Labs, North Chicago, Illinois; serum antytyroksyny (królik): Wien Labs., Succasunna, New Jersey; kwas chlorowodorowy kat. nr A-144, Fisher Scientific, New York; wodorotlenek sodu 0,1 N kat. nr SO-S-276, Fisher Scientific; barbital sodu kat. nr B-22, Fisher Scientific; azydek sodu kat. nr S-227, Fisher Scientific; normalne serum królika; kwas S-anilino-1-naftaleno/sulfoniowy, sól sodu (ANS) kat. nr 9041, K & K Labs, Plainview, New York; normalna zebrańska plazma, Plasma Products; aktywowany węgiel drzewny, Daroo G-60, Mafheson, Coleman & Bell, Rutherford, New Jersey; sofadeks G-25, drobny chromatograficzny żel, Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N. J.; kolumny dla chromatograficznego żelu kat. nr 102/2, Walter Sarstedt, Inc., Princeton, N. J.; badawcze rurki 12×75 mm i 17×100 mm.

Poniżej opisano zastosowane odczynniki. Kwas 6 N chlorowodorowy w ilości 1 litra i buforowy barbital, 0,075M, pH 8,6, 1 litr.

Rozpuszczono 15,54 g barbitalu sodu i 100 mg azydku sodu w 800 ml destylowanej wody. Stosując wzorcowany pehametr doprowadza się pH roztworu do 8,6 dodając kroplomierzem 6N HCl, cały czas mieszając starannie barbital. W przybliżeniu potrzeba 2 ml 6N HCl. Uzupełnia się do 1 litra wodą destylowaną. Ten buforowy roztwór jest dobry w ciągu jednego miesiąca przy przechowywaniu go w chłodziarce. Następnie stosuje się 2% normalny roztwór buforowy serum królika — barbital w ilości 100 ml. Dodaje się 2 ml normalnego serum królika do 98 ml buforowego barbitalu starannie mieszając. Roztwór ten jest dobry w ciągu 2 tygodni przy przechowywaniu go w chłodziarce. Poza tym stosuje się plazmę ludzką bez tyroksyny w ilości 20 ml. Starannie mieszając dodaje się 3 g aktywowanego węgla drzewnego do 20 ml zebranej ludzkiej plazmy w będącej do dyspozycji 50 ml stożkowej wirówkowej rurce starając się zwilżyć całość węgla drzewnego. Przykrywa się mieszaninę i umieszcza na noc w chłodziarce. Następnego dnia mieszaninę poddaje się wirowaniu z prędkością 8000 obr/min w ciągu 10 minut. Wówczas stosując 20 ml strzykawkę wyposażoną w 25 mm uchwyt z filtrem miliporowym i nasadką Swinnex, filtruje się sklarowaną ciecz kolejno przez filtr papierowy filtr 0,45 mikronowy i filtr 0,22 mikronowy. Przygotowuje się tygodniowo i wsta-

wia do chłodziarki lub po zamrożeniu nadaje się do stosowania w ciągu co najmniej 3 miesięcy.

Przygotowanie wzorców tyroksyny (T-4) jest opisane poniżej.

Surowiec T-4 w ilości 0,6 mg/ml, otrzymuje się w ten sposób, że rozpuszcza się 6,00 mg surowca T-4 w minimalnej objętości 0,1 N wodorotlenku sodu. Dopelnia się destylowaną wodą do objętości 10 ml. Otrzymany roztwór może być rozdzielony na 0,2 ml ampułki i magazynowany w stanie zamrożonym w ciągu 3 miesięcy.

Jako robocze wzorce przygotowuje się próbkowe rurki o wymiarach 12×75 mm i oznacza od 1 do 5. Robocze wzorce T-4 przygotowuje się według poniższej tablicy 3.

Tablica 3

Rurka nr	Dodatek buforowego barbitalu	Usuwanie roztworu buforowego	Dodatek surowca T-4	Końcowa koncentracja
1	1,0 ml	0 µl	0 µl	0 µg/ml
2	1,0 ml	10 µl	10 µl Surowiec T-4 rozpuszczony w 3	2 µg/ml
3	1,0 ml	10 µl	10 µl	6 µg/ml
4	1,0 ml	20 µl	20 µl	12 µg/ml
5	1,0 ml	50 µl	50 µl	30 µg/ml

Stosowane wzorce, wykonuje się w ten sposób, że oznacza się próbkowe rurki o wymiarach 17×100 mm liczbami od 1 do 5 i dodaje się do każdej z nich 5,0 ml plazmy bez T-4. Usuwa się 50 mikrolitrów odpowiedniego roboczego wzorca opisanego powyżej. Dobrze miesza się. Końcowe wyniki podano w tablicy 4.

Tablica 4

Rurka nr	T-4 µg/ml	T-4 µg/35 µl	T-4 µg/100 ml
1 a	0	0	0
2 b	20	0,7	2
3 c	60	2,1	6
4 d	120	4,2	12
5 e	300	10,5	30

Zamraża się w 0,5 ml objętościach.

Roztwór tyroksyny I¹²⁵ złożony jest z roztworu ANS, dla otrzymania którego rozpuszcza się 60 mg kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego w 10 ml 2% normalnego roztworu buforowego serum królika oraz z roztworu izotopowego.

A_{min} dla Tetramet-125 wynosi 500 mikrokiurów. Roztwór jest dobry w ciągu sześciu tygodni. Data ważności jest podana na nalepce Abbotta. Aktywność, to jest liczba mikrokiurów na milimetr, zmienia się zależnie od partii. 14 000 jednostek na minutę (CPM) dodaje się do każdej próbkowej rurki w 50 mikrolitrach, przy czym 14 000 opm w przybliżeniu odpowiada 0,014 mikrokiurów. Określa się całkowitą liczbę próbkowych rurek, wzorców i nieznanych, zwiększa się ich ilość o 10%, które oznaczają współczynnik bezpieczeństwa i mnoży się końcową liczbę przez 0,014. Otrzymana liczba stanowi całkowitą potrzebną liczbę mikrokiurów. Następnie mnoży się całkowitą liczbę rurek łącznie

z 10% nadwyżką przez 50. Otrzymuje się całkowitą potrzebną liczbę mililitrów ANS. Odejmuje się ilość mikrolitrów Tetramet — 125 odpowiednio do liczby mikrokiurów i dodaje się do prawidłowej objętości ANS. Przygotowuje się do stosowania na dany dzień.

Odczynnik przeciwciała pochodzi z Wien Lab i jest liofilizowany w ampułkach z nalepkami „100 Test”. Każda ampulka jest potraktowana 14,0 ml 2% normalnego roztworu buforowego serum królika. Jest ono dobre w ciągu 2 tygodni przy przechowywaniu go w chłodziarce.

Warunki reakcji są poniżej opisane. 50 mikrolitrów roztworu T-4-¹²⁵I, 35 mikrolitrów wzorca lub próbki serum i 65 mikrolitrów destylowanej wody zmieszane razem. Następnie dodano 200 mikrolitrów odczynnika przeciwciała. Reakcja przebiegała w ciągu 30 minut w temperaturze pokojowej przy pierwszej prędkości zestawu inkubator-separator i po zwiększeniu prędkości do drugiej prędkości całkowitą objętość poreakcyjną przemieszczono do kolumny z drobnego sefadesu G-25. Kompleks wymywano 2,0 ml buforowego barbitalu. Kompleks badano w ciągu 1 minuty licznikiem promieni gamma. Każdą próbkę i każdy wzorec brano podwójnie. Wzorce 1—5 zajmowały więc 10 położeń.

Wzorce uwzględniono na wykresie następująco: wskaźniki na minutę na osi y, a log ilości w µg/100 ml na osi x. Wzorcami przygotowanymi w powyżej opisany sposób były: 0, 2, 6, 12, 30 µg tyroksyny na 100 ml. Nieznane próbki określano z krzywej wzorcowej przez znalezienie wartości µg tyroksyny na 100 ml odpowiadającej wskaźnikom nieznanych próbek. Substancją poddawaną analizie były kliniczne próbki serum.

W przykładzie wykonania wynalazku przedstawionym powyżej szczególne korzyści uzyskuje się zasadniczo dzięki przerwaniu opisanej reakcji tworzenia kompleksu po szybkim oddzieleniu składników produktu reakcji w regulowanych warunkach w chromatograficznych kolumnach 200.

Dla rozważenia ogólnego przypadku, w którym reagenty A i B wprowadza się odpowiednio do wewnętrznych i zewnętrznych pojemników 130 i 140 i powoduje się ich mieszanie i reagowanie ze sobą w zewnętrznych pojemnikach dla wytworzenia zwiększających się ilości produktu reakcji C przez rozdzielanie mieszaniny A, B i C w chromatograficznych kolumnach 200 na fazy, z których jedną zawierającą co najmniej jeden reagent, A lub B zbiera się w rurkach 65, reakcję wytwarzania C zasadniczo zatrzymuje się w zbierających chromatograficznych kolumnach i nawet przy kontynuowaniu obracania nie wytwarza się dalsza ilość C a więc jest wymywana i mierzony parametr wymywanej fazy, na przykład radioaktywność, kolor, fluorescencja, zawartość enzymów, jest stały w tym samym okresie czasu dla wszystkich analizowanych próbek. Ten przykład wykonania jest szczególnie korzystny w kinetycznych analizach dla określenia w próbce ilości hormonów tarczycowych, hormonów płciowych, glikozydów sercowych, witamin, antygenów rakowych przy zastosowaniu wzorcowych odpornych na radioaktywność odczynników.

Powyższe rozważania będą bardziej zrozumiałe w odniesieniu do fig. 5a, która schematycznie przedstawia moment, w którym nieprzereagowana część reagentów A i B oraz produktu reakcji C została przemieszczona do chromatograficznego żelu 200' lecz przed przemieszczeniem cieczy wymywającej do tego samego żelu 200'. W takich warunkach A i B mogą nadal reagować ze sobą i wytwarzać dodatkowe ilości C. Jednakże po przepływie cieczy wymywającej do chromatograficznego żelu 200', który jest dobrany w tym przykładzie tak, żeby oddzielał reagent B wraz z produktem

reakcji C, B i A zostają gwałtownie oddzielone od A w fazie, która porusza się wzdłuż chromatograficznego żelu 200', jak pokazano na fig. 5b, i wstrzymuje tworzenie się dodatkowych ilości produktu reakcji C. Fazę 152 zawierającą ustalone udziały B i C przemieszcza się za pomocą siły odśrodkowej do rurki 65', jak pokazano na fig. 5c i można wówczas mierzyć w odpowiednim momencie ustaloną wartość interesującego parametru albo B albo C.

W innych zastosowaniach urządzenia według wynalazku, w których nie ma decydującego znaczenia wstrzymywanie reakcji w chromatograficznej kolumnie 200 a warunki reakcji i rozdzielania są zasadniczo takie same dla wszystkich próbek, chromatograficzny żel tak się dobiera, żeby wymywać i oddzielać produkt reakcji od reagentów, zwłaszcza w przypadkach, gdzie dalsze formowanie produktu reakcji w żelu i jego wymywania jest kompensowane przez stosowanie równocześnie traktowanego wzorca.

W zastosowaniach wynalazku interesującym parametrem może być radioaktywność, jak szczególnie opisano powyżej, kolor, fluorescencja lub dowolna inna fizyczna własność. Odpowiednio zamiast układu licznika radioaktywności można stosować inne znane czujnikowe urządzenia.

W innym przykładzie wykonania urządzenia według wynalazku pokazanym na fig. 6 przyrząd zawiera tarczę 510 mającą wiele pojedynczych wgłębień 520 zamiast par promieniowo ustawionych pojemników 130 i 140 w urządzeniu pokazanym na fig. 1.

W przyrządzie pokazanym na fig. 6 dokładne ilości dwóch lub więcej reagentów, na przykład serum oraz odczynnik 525 umieszcza się we wgłębieniach 520, w których odbywa się reakcja, w wyniku której powstaje produkt reakcji dający się oddzielać fizycznie. Napełnianie wgłębień 520 może być realizowane pipetą jak opisano powyżej. Jedno lub więcej wgłębień 520 wypełnia się wzorcowymi reagentami w poprzednio opisany sposób i tak wypełnioną tarczę 510 ustawia się na utrzymującym członie 15 w taki sam sposób jak tarczę 110 na fig. 1 i obraca się z prędkością wystarczającą do przemieszczenia zawartości wgłębień 520 do połączonych z nimi separatorów 190 w wyniku działania siły odśrodkowej. Od tego momentu postępuje się w ten sam sposób jak w przypadku opisanego powyżej w odniesieniu do przyrządu, pokazanego na fig. 1 i wzorca przykładowo zilustrowanego na fig. 4.

W praktyce w tym przykładzie wykonania ponieważ tarcza 510 zawiera wgłębienia 520, a więc mogą być one wypełniane reagentami a reakcja może być doprowadzona do stanu równowagi. Oznacza to, że tarcze 510 można wypełniać i przechowywać w długich okresach czasu, na przykład w ciągu godzin lub dłużej, po czym tarcze 510 można umieszczać na miejscu tarcz 110 w przyrządzie pokazanym na fig. 1 i można prowadzić analizę jak opisano powyżej. Ten przykład wykonania efektywnie nadaje się do zastosowania do powolnych reakcji, na przykład określania w serum krwi hormonu wzrostu, które w przypadku użycia poprzednio opisanego podwójnego układu wgłębień wymagają bardzo długiego okresu wirowania z większą prędkością obrotową, na przykład 1 godziny lub dłużej.

Alternatywnie w przypadku gdy tarcze 510 napełnia się w takim okresie czasu aby przeprowadzić szczególnie powolną reakcję, wówczas istotną sprawą jest, żeby reakcje w różnych pojedynczych wgłębieniach rozpoczynały się w tym samym czasie, napełniania tarcza 510 była obracana a zawartość wgłębień 520 były przemieszczane do połączonych z nimi separatorów 190 w takim okresie czasu, aby

we wgłębieniach 520 powstała dająca się zmierzyć ilość oddzielnego składnika. Procedura ta jest użyteczna w przypadkach, w których zmniejszenie dokładności analizy wynikające z różnych okresów czasu reakcji w różnych wgłębieniach nie ma dużego znaczenia wobec oszczędności czasu.

Szczególną zaletą mechanicznego i chemicznego ciągłego sposobu tandemowego jest to, że zasadniczo eliminuje się ręczną lub mechaniczną interwencję w czasie prowadzenia analizy, co minimalizuje znaczenie zmiennych parametrów innych niż potrzebnych oraz że stosuje się krótki czas reakcji i jej kinetykę reguluje się poprzez regulację czasu.

Dla celów wynalazku reagujące składniki obejmują substancje reagujące chemicznie dla wytworzenia innego chemicznie produktu lub produktów reakcji a także substancje reagujące fizycznie, na przykład wykorzystując zjawiska adsorpcji, dla wytworzenia jednego lub większej ilości materiałów różniących się fizycznie.

Separatorem ciekłej fazy może być dowolne urządzenie chromatograficzne, na przykład zapewniające oddzielanie na bazie wymiaru cząstek, zjawiska fizycznej adsorpcji, chemisorpcji, wymiany jonowej, właściwego cząstkowego powinowactwa (powinowactwo chromatograficzne) i innych znanych sposobów, w których stosuje się na przykład żele, ciała stałe i żywice.

Zastrzeżenia patentowe

1. Urządzenie do przeprowadzania analizy wielu próbek płynu, **znamiennie tym**, że zawiera obrotowy człon podtrzymujący (15) mający wiele zasadniczo kołowo rozmieszczonych pojemników (130), w których znajduje się ciecz i wiele zasadniczo kołowo rozmieszczonych pojemników (140), w których także znajduje się ciecz, oraz wiele separatorów (190) ciekłej fazy ustawionych zasadniczo kołowo, przy czym pojemniki (130), (140), oraz separatory (190) ciekłej fazy są ustawione zasadniczo współśrodkowo wokół wspólnej osi, a separatory (190) ciekłej fazy są promieniowo oddalone od pojemników (140) a pojemniki (140) są promieniowo oddalone od pojemników (130), zaś separatory (190) ciekłej fazy są tandemowo połączone z pojemnikami (140), które z kolei są tandemowo połączone z pojemnikami (130), przy czym z separatorem (190) ciekłej fazy jest połączony zbiornik na ciecz zbierający ciecz oddzieloną przez ten separator (190).

2. Urządzenie, według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że na członie obrotowym (15) osadzona jest tarcza (110) obracająca się w zasadniczo poziomej płaszczyźnie wokół swej osi środkowej za pomocą tego członu (15), która to tarcza (110) zawiera pierwszy rząd wgłębień stanowiących pojemniki (130) na ciecz usytuowane w równej promieniowej odległości od środkowej osi tarczy (110) oraz drugi rząd wgłębień, stanowiących pojemniki (140) na ciecz usytuowane w większej jednakowej promieniowej odległości od pierwszego rzędu, przy czym pojemniki (130) pierwszego rzędu leżą zasadniczo w jednych promieniowych liniach z pojemnikami (140) drugiego szeregu a ponadto pomiędzy ustawionymi w jednej linii pojemnikami (130) i (140) znajdują się korytkowe przejścia (500) dla cieczy przepływającej z pojemników (130) do pojemników (140) w wyniku działania siły odśrodkowej, przy czym w jednej linii z pojemnikami (140) umieszczone są separatory (190) ciekłej fazy, obracające się wraz z obrotowym członem (15), a ponadto w jednej linii z pojemnikami (140) i separatorami (190) ciekłej fazy znajdują się drugie korytkowe przejścia (600) dla przepływu

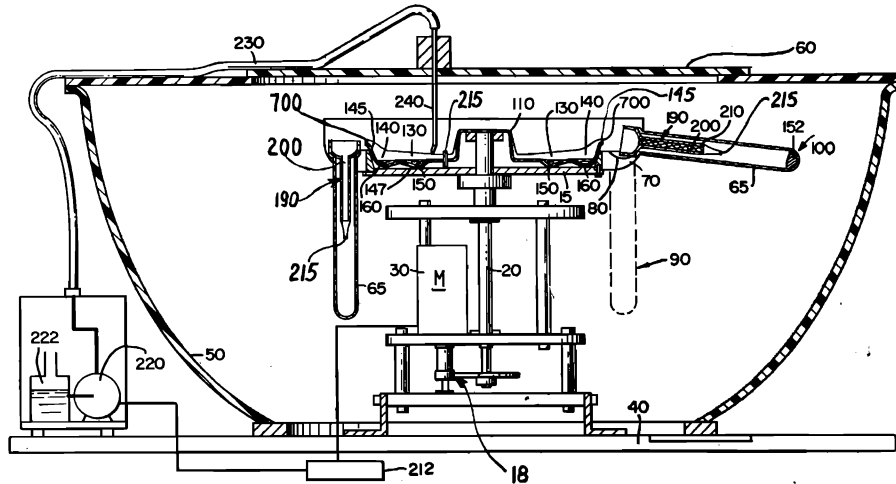
13*

cieczy wypływającej z pojemników (140) w wyniku działania siły odśrodkowej, przy czym przejścia korytkowe (600) mają większą pochyłość od przejść korytkowych (500) aby siła odśrodkowa wymagana do spowodowania przepływu cieczy z pojemników (140) drugiego rzędu była większa od siły odśrodkowej wymaganej do spowodowania przepływu cieczy z pojemników (130) pierwszego rzędu.

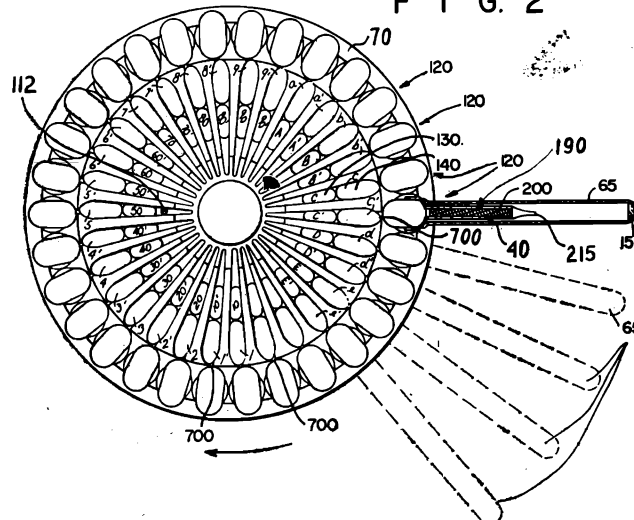
14

3. Urządzenie, według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że separatory (190) ciekłej fazy stanowią pojedyncze kolumny (200) zamocowane obrotowo i odchylnie aż do położenia (100) w wyniku działania siły odśrodkowej, przy czym oś podłużna każdej kolumny (200) ustawiona jest zasadniczo promieniowo względem osi środkowej tarczy (110).

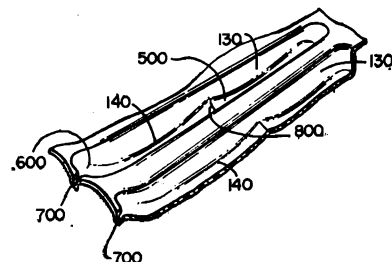
F I G. 1



F I G. 2



F I G. 2a



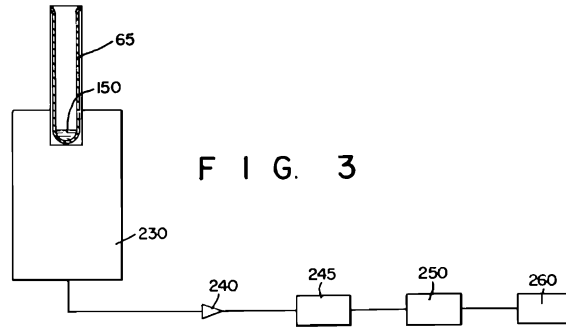


FIG. 3

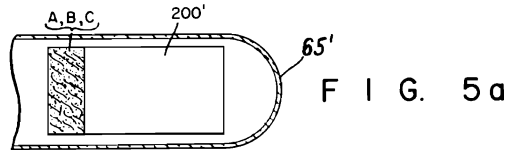


FIG. 5a

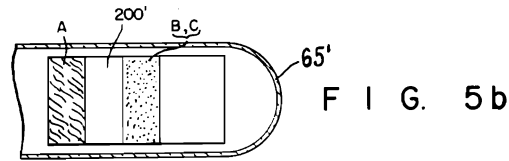


FIG. 5b

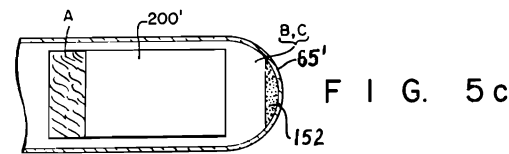


FIG. 5c

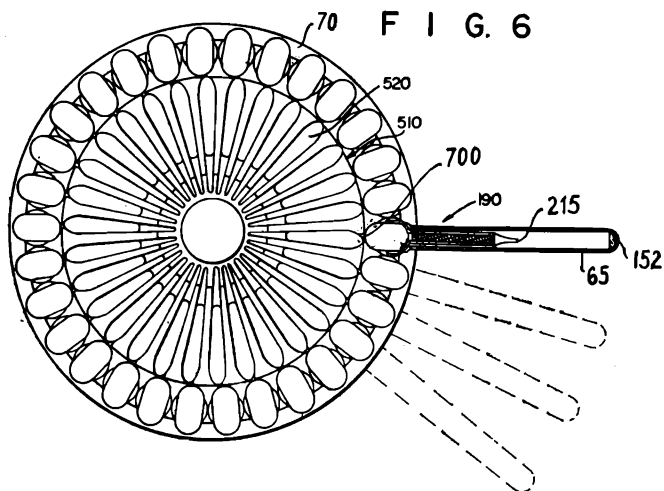


FIG. 6

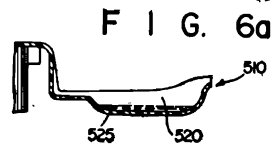


FIG. 6a

F I G. 4

