

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4303594号
(P4303594)

(45) 発行日 平成21年7月29日(2009.7.29)

(24) 登録日 平成21年5月1日(2009.5.1)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 F 23/28 (2006.01)	GO 1 F 23/28 H
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z
GO 1 N 21/03 (2006.01)	GO 1 N 21/03 Z
GO 1 N 21/27 (2006.01)	GO 1 N 21/27 Z

請求項の数 21 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2003-551517 (P2003-551517)	(73) 特許権者	504226065
(86) (22) 出願日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		アーテル インク
(65) 公表番号	特表2005-512085 (P2005-512085A)		アメリカ合衆国 メイン州 04092
(43) 公表日	平成17年4月28日 (2005.4.28)		ウェストブルック ブラッドリー ドライ ブ 25
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/037603	(74) 代理人	100092646
(87) 国際公開番号	W02003/050515		弁理士 水野 清
(87) 国際公開日	平成15年6月19日 (2003.6.19)	(74) 代理人	100083769
審査請求日	平成17年12月7日 (2005.12.7)		弁理士 北村 仁
(31) 優先権主張番号	10/021, 112	(72) 発明者	リチャード エイチ カーティス
(32) 優先日	平成13年12月12日 (2001.12.12)		アメリカ合衆国 メイン州 04038
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ゴーハム ワーズヒルロード 76
		審査官	松川 直樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体容量の光度検量

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1の波長で最大限の吸光度を有する第1の発色団および第2の波長で最大限の吸光度を有する第2の発色団を含んでいるサンプル溶液であって、その容量が未知であるサンプル溶液を供給する工程、

電磁線に前記サンプル溶液を露光する工程、

各発色団によって前記電磁線の吸光度を測定する工程、

前記第1の発色団が除かれ、前記サンプル溶液における第2の発色団と等しい濃度の第2の発色団を含んでいる容量が未知の基準溶液を電磁線に露光する工程、

前記基準溶液の吸光度を測定する工程、

および、その後、前記基準溶液と前記サンプル溶液の測定した吸光度に基づいて前記サンプル溶液の容量を決定する工程、

の各工程を具備しているサンプル溶液の液体容量の検量方法。

【請求項 2】

希釈剤で前記サンプル溶液を希釈する工程を具備している請求の範囲1の方法。

【請求項 3】

前記希釈剤が基準溶液であることを特徴とする請求の範囲2の方法。

【請求項 4】

前記サンプル溶液の容量を決定する工程が、修正要素を含む工程を含み、該修正要素は、該サンプル溶液の重量に基づいて該サンプル溶液の容量を計算すること、及び該サンプ

10

20

ル溶液の重量から計算された容量と測定された吸光度から決定された容量とを比較することで得られることを特徴とする請求の範囲 1 の方法。

【請求項 5】

前記第 2 の発色団が銅塩化物及び硫酸銅から選ばれる化合物を含む可溶銅塩であることを特徴とする請求の範囲 1 の方法。

【請求項 6】

前記サンプル溶液が更に、前記可溶銅塩の EDTA を含むキレート剤、及びフタル酸化合物を含む pH 緩衝液を含み、且つ、前記第 1 の発色団が、アマランス (Amaranth)、ポンソーエス (Ponceau S)、及びアシッドレッド 1 (Acid Red 1) から選ばれる化合物であることを特徴とする請求の範囲 5 の方法。

10

【請求項 7】

前記第 1 の発色団及び前記第 2 の発色団の一方又は両方として、吸光度の減少した温度依存性を示す発色団を選択する工程を具備していることを特徴とする請求の範囲 1 の方法。

【請求項 8】

前記決定する工程の前に前記第 1 の発色団及び前記第 2 の発色団の温度を測定する工程を具備し、前記決定する工程に前記第 1 の発色団と前記第 2 の発色団の温度依存性に関する修正要素を含む請求の範囲 1 の方法。

【請求項 9】

複数のサンプル溶液を提供し、各々は前記第 1 の発色団の固有の濃度を有し、
該複数のサンプル溶液が複数の液溜めプレートに提供され、
且つ、前記決定する工程が該液溜めプレートの各液溜めに前記サンプル溶液の容量を決定することを含んでいる請求の範囲 1 の方法。

20

【請求項 10】

前記複数のサンプル溶液の容量は、該複数のサンプル溶液のそれぞれの測定された吸光度、前記基準溶液の測定された吸光度、及び 0.5 パーセント以上でない正確性のレベルに前記複数の液溜めプレートの各液溜めの少なくともひとつの寸法を測定することから決定される請求の範囲 9 の方法。

【請求項 11】

前記サンプル溶液がサンプルホルダーに含有され、前記電磁線に露光する工程が前記サンプル溶液と前記サンプルホルダーの壁のメニスカスの間に 80 度から 100 度までの接触角を維持することを含んでいる請求の範囲 1 の方法。

30

【請求項 12】

前記維持の工程が要求する接触角を保つために濃度において前記サンプル溶液に塩を供給することを含んでいる請求の範囲 11 の方法。

【請求項 13】

各液溜めが透明な底を有する請求の範囲 11 の方法。

【請求項 14】

前記露光する工程が前記透明な底を通して前記電磁線を向けていることを含んでいる請求の範囲 13 の方法。

40

【請求項 15】

測定した吸光度を格納するためのコンピュータ実行ソフトウェアを利用する工程を具備し、該ソフトウェアは該測定した吸光度から容量を計算する請求の範囲 1 の方法。

【請求項 16】

電磁線を放射し、検出する分光光度計と、複数の容量が未知のサンプル溶液を含有し、前記電磁線にサンプル溶液を露光するための複数の液溜めプレートと、第 1 の波長で最大限の吸光度を有する第 1 の発色団および第 2 の波長で最大限の吸光度を有する第 2 の発色団を含んでいる複数のサンプル溶液の各々と、少なくとも第 1 の発色団の固有の濃度を有する各サンプル溶液と、

および第 1 の発色団が除かれ、前記サンプル溶液における第 2 の発色団に等しい濃度で

50

前記第2の発色団を含んでいる別個の容量が未知の基準溶液
とを具備する液体容量の検出システム。

【請求項17】

複数の容量が未知のサンプル溶液と、各サンプル溶液は第1の波長で最大限の吸光度を有する第1の発色団および第2の波長で最大限の吸光度を有する第2の発色団を含み、且つ少なくとも第1の発色団が特徴ある濃度を有し、

複数のサンプル溶液を含有し、電磁線にサンプル溶液を露光する為の複数の液溜めプレートと、複数の液溜めプレートの各々の液溜めの少なくとも1つの寸法は0.5パーセント以上でない誤差のレベルである幅寸法を有し、

および第1の発色団が除かれ、前記サンプル溶液における第2の発色団に等しい濃度で前記第2の発色団を含んでいる別個の容量が未知の基準溶液
とを具備するシステム。

10

【請求項18】

前記複数のサンプル溶液の1以上が濃縮されたサンプル溶液であり、更に電磁線に露光したときに該濃縮されたサンプル溶液を希釈するための希釈剤を含み、前記希釈された1以上の濃縮されたサンプル溶液は、第1の波長で0.5センチメートルの幅において0.1から3までの範囲でピーク吸光度を有している前記第1の発色団を含むことを特徴とする請求の範囲17のシステム。

【請求項19】

前記第2の発色団が第2の波長で0.5センチメートルの幅において0.1から1.5
までの範囲でピーク吸光度を有している請求の範囲17のシステム。

20

【請求項20】

第2の分光光度計で第1の分光光度計を検量する検量盤であって、第1の検量溶液セットを含む複数の容器を有する検量盤と、

第1の波長で最大限の吸光度を有する第1の発色団および第2の波長で最大限の吸光度を有する第2の発色団を含んでいる第2の容量が未知のサンプル溶液のセットと、

第1の分光光度計において使用する複数のサンプル溶液を含有する複数の液溜めプレートと、

第1の発色団が除かれ、サンプル溶液における第2の発色団に等しい濃度で第2の発色団を含んでいる別個の容量が未知の基準溶液
とを具備しているシステム。

30

【請求項21】

それぞれの発色団の吸光度を測定する前に、前記サンプル溶液と前記基準溶液を混合する工程を更に含む請求項1の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、液体の容量を測定および検量する装置とその方法に関する。液体の容量は、同時にまたは連続的に、1つまたは複数の流体の流出口またはノズルの先端から放出する。

40

試験測定論、結果を検量するアルゴリズム、液試薬のシステム、光度読取器の検量方法、これらの動作を調整、制御および実行するソフトウェアを記載する。

【背景技術】

【0002】

多くの分析方法は、生物学、化学、バイオテクノロジー、医薬品および少ない液量の正確な測定および/または検量を要求する他の調査試験所で使用されている。これらの少量はナノリットルからミリリットルに分類することができる。

ある出願では、少ない液量は、単一の放出する流体の流出口または同時に、あるいは連続的に液体を放出するように配置した複数の流体の流出口を有する液体放出装置から分配される。特殊な例では、一度に8または12チャンネルを放出するように配置した手持ち可能

50

な複数のチャンネルピペットを含んでおり、また一度に96または384チャンネルを放出するように配置した自動化した放出装置がある。

他の出願では、少量の容器に含まれた正確の液量を測定したものがあ

【0003】

液体放出装置用として、放出は理想的には正確かつ精密であること。与えられた時間で、放出装置は、工程の必要条件または製造者の仕様書どおりに機能していなくてもよい。この理由として、放出装置の正しい操作と分析の完全さを保証するために定期的に放出装置を検量するのが最もよい。

複数のチャンネル放出装置は、直ちに多数の見本の分析または工程を促進するために、または直ちに多数の異なる属性のためひとつの見本を分析するために典型的に使用されている。複数の分析工程の完全さを確認するために、その装置は分析の時点で正確に機能しなければならない。便利な、正確なおよび/または精密な検量動作をちょうどよい時に妨げる多くの制限を有する検量方法が仮に存在するとしたら、分析結果に問題を促す。

これらのいくつかの実存する検量方法を以下に記載する。

重量方法では、液量は重さによって決定される。最初に受取チューブの重量を計ったのち、液量がそのチューブの中に充填される。流体の密度、工程中の蒸発による液体の減少、および空気の浮力の補正後に、チューブの重量が再度測定され、充填したチューブの重さの増加は、液量の検量を導く。

【0004】

しかしながら、重量方法は特に複数の液量を検量するために、数百の液体放出が同時に発生する複数のチャンネルを有する液体放出装置で行ったときには、非常に時間が掛かっている。少ない放出量の場合には、振動、通風、静電気および/または蒸気によって測定に発生するエラーは、問題となる実用性または有効性に対しこの方法が原因となる。

重量方法は、受取容器としてマイクロ滴定量盤を使用して複数量を測ることが可能である。マイクロ滴定量盤は、放出される液体を受取るために多数の小さい穴または液溜めを有する長方形の成形樹脂板である。典型的なマイクロ滴定量盤は、96または384個の液溜めを有している。この方法では、液溜めに放出された液量を個々に測定することはできない。完全なマイクロ滴定量盤は液体なしで測定され、液溜めに充満しており、その後、マイクロ滴定量盤が再度計量される。重量増加の結果は、流体密度、蒸発および空気浮力として計算することにより、液量に変化を与える。マイクロ滴定量盤に含まれた全体の容量は、充満した液溜めの数によって分配される。このように、この手段は、平均的な液体放出量を測定する。

【0005】

この方法は、流体の流出口から放出される量が分からないので、複数の流出口放出装置を検量するには不都合がある。

光度方法において、透明な底面を有するサンプルホルダーが決められた液量を受取る。光線は底面および液体を通して、結果として検出器に投射する。吸光する光量、すなわち吸光度は液体の深さにデータを提供し、このように、液量は濃度およびモル吸光係数(または吸光係数)のような液体構成材料のある特性を有する。

例えば、仮に液量が光を吸光できる染料を含有しているならば、現在の液量は液溜めを介して所有しているときに、吸光した光量を測定することによって概算できる。与えられた液溜めの中により多くの液体が分配されればされる程、液体の柱はより深くなり、吸光した光はより多くなる。

【0006】

この技術によって液体の吸光を測定する分光光度計は、よく知られており、一般にはマイクロプレート読取器またはマイクロ滴定量プレート読取器と呼ばれ、その場合に光度方法が特に構成したマイクロ滴定量プレート読取器を使用する。しかしながら、現在の器具では、光度方法は多くの使用のために等しい正確度のレベルを提供できない。

10

20

30

40

50

検量する別の手段は、マイクロ滴定量プレートの中にあるフルオレスセインのような稀薄フルオロフォールの容量を含有する液体を測定する方法である。

特殊なプレート読取器は、マイクロ滴定量プレートの各々の液溜めから来る蛍光量を計る。光度方法として、この方法は一般に多くのユーザーの必要性を満足させるのに十分に正確ではない。国家基準（例えば、ASTMのような認識された基準体制で規定したように）に当てはまる定量結果を提供するためにだけ使用されることが不可能である蛍光読取器の感度を検量する安定したまたは認識した基準は全くない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

発明の要約

選択した実施例において、本発明は使用し、速い、正確なそして精密な液体放出装置の検量方法およびその装置を容易に提供する。本発明は国家基準内に当てはまる結果を提供する。

この方法は、複数のチャンネルを有する放出装置のような少ない液量を検量するのに特に有益である。本発明は半熟練した研究所の専門家にその装置を実務的に容易に使用させおよびデータ保全を提供するスケジュールに使用される。

20

本発明のひとつの観点は、この方法が液量を検量することを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

この方法は、第1の波長で最大限の吸光を有する発色団と、第2の波長で最大限の吸光を有する発色団とを含むサンプル溶液を提供することを含んでいる。第1および第2の違いは、最大限の吸光が少なくとも約100nmである。

サンプル溶液は、電磁線に放射し、各発色団による吸光は測定される。

目的溶液はまた電磁線に放射し、第1の発光団を離れ、サンプル溶液における等しい濃度に第2の発光団を含んで提供する。

目的溶液の吸光は測定される。サンプル溶液量は、目的溶液およびサンプル溶液の測定した吸光に基づいて決定される。

30

【0009】

本発明の第2の観点は、液量の検量システムは、電磁線を放射したり、検量する分光光度計を提供することである。複数の液溜めプレートは、複数のサンプル溶液を含有し、電磁線に溶液を放射することを提供する。複数のサンプル溶液の各々は、第1の波長で最大限の吸光を有する第1の発色団および第2の波長で最大限の吸光を有する第2の発色団と、最大限で少なくとも100nmである第1および第2の吸光の間での違いと、少なくとも第1発光団の特徴ある濃度を有する各々のサンプル溶液とを含んでいる。

別々の目的溶液は第1発色団を離れ、サンプルにおいて等しい濃度に第2発色団を含んで提供する。

40

本発明の別の観点は、システムが直前のパラグラフに記載した複数のサンプル溶液と、複数のサンプル溶液を含有し、電磁線に溶液を放射する複数の液溜めプレートとを含んで提供することである。複数の液溜めプレートの各々の液溜めは、0.5%以上でない正確性のレベルを供給した幅を有する。別個の目的溶液は、第1発色団を離れ、第2発色団を含んで提供する。

本発明の別の観点は、システムは第2の分光光度計で第1の分光光度計を検量する検量プレートと、第1の検量液量セットを含有する複数の孔を有する検量プレートとを含んで提供する。更に、このシステムは第1の波長で最大限の吸光を有する第1発色団および第2の波長で最大限の吸光を有する第2発色団と、最大限で少なくとも100nmである第1お

50

よび第2吸光の違いとを含む第2の各サンプル溶液セットを含んでいる。
複数の液溜めプレートは、第1分光光度計で複数のサンプル分解を含有するために提供する。別個の目的溶液は、第1発色団を離れ、サンプル溶液における等しい濃度に第2発色団を含んで提供する。

【0010】

本発明の別の観点は、液量を決定する方法を提供することである。この方法は、複数の液溜めプレートを提供する段階、複数の液溜めプレートの液溜めに含有する、知られていない容量を有するサンプル溶液を提供する段階、サンプル溶液と液溜めメニスカス間に約80~100度の接触角と、サンプル溶液における1以上の発色団、塩、緩衝液の濃度によって決定される接触角とを維持する段階とを含んでいる。
サンプル溶液は電磁線に放射され、発色団の吸光は測定される。溶液量は測定した吸光および発色団の濃度に基づいて決定される。

10

また別の実施例において、コンピュータの独占可能なソフトウェアコードは、コンピュータの読取可能な媒体と、サンプル溶液における発色団の濃度と、読取りにおけるサンプル読取器に形成された幅と、読取りのランベルト・ベールの法則による非線形性の認定とに基づく吸光の光度読取りに基づく液体サンプル溶液量を計算するためのコードを含むコードとに格納される。

【図面の簡単な説明】

20

【0011】

【図1】図1は、幅を供給する平行に対向する透明な液溜めを有する容器の一実施例を示す概略図である。

【図2】図2は、分光分析法による垂直光を図示した透明な底を有する容器で、可変な幅を供給する変化する液量を調節する別の実施例を示す横断略図である。

【図3】図3Aは、接触角、90度を提供する理想的な平らなメニスカスを表現している容器における溶液の横断略図である。図3Bは、溶液が90度以上の接触角を提供する凸状のメニスカスを表現している容器における溶液の横断略図である。図3Cは、溶液が90度以下の接触角を提供する凹状のメニスカスを表現している容器における溶液の横断略図である。

30

【図4】図4は、図1に図示した容器に類似する一連の容器を有する検量プレートの一実施例を示す概略図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

詳細な説明

本発明のひとつの観点は、液量を検量する方法を提供することにある。検量には、第1および第2発色団を有するサンプル溶液と、第2発色団だけを有する目的溶液または基準溶液、すなわち第1発色団を免れている目的溶液とを使用する。サンプル溶液および目的溶液における第2発色団の濃度は同じである。目的溶液を希釈剤として供給する。仮に希釈剤がサンプル溶液に追加されるなら、好適な追加量は2つの波長での読取りに基づいて計算される。

40

先行する光度検量の技術は、基準溶液またはサンプル溶液のいずれか一方と、理想的な大きさでないサンプル容器とにひとつの発色団だけを供給する。1個のデータ、すなわち吸光だけであるが、サンプル溶液量と希釈剤の容量との2つの知られていない結果である。対比すると、サンプル溶液における2つの発色団の手段は、希釈剤溶液量とサンプル溶液量の双方を計算するのに十分な情報を供給する検量用の2つの基準点、すなわち2つの波長で2つの吸光の読取りを付与するものである。

このように、発明のこの観点は以下により詳細に記述したように、より高い正確さと精密さを導くものである。

50

ひとつの実施例では、検量の技術は発色団がランベルト・ベールの法則に従うひとつのサンプル溶液にだけ適用できる。この法則によると、液体と幅 を通過する光 A の吸光間の関係は、(1) に示すとおりである。

【0013】

【数1】

$$A = \epsilon c l \quad (1)$$

【0014】

この場合に、 は発色団のモルの吸光係数（時には、吸光係数と呼ばれる）であり、また c は 1 リットル毎のモルにおける吸光係数の濃度である。後半の 2 の容量は試液の製造において決定される。仮にそれらの容量の値が知られているならば、溶液の吸光 A は光度器具で測定され、その後幅 は計算によって決定できる。

10

基準溶液およびサンプル溶液は、好適には電磁スペクトルの紫外線可視光の領域において、電磁線に放射する。ひとつの実施では、電磁線の露光は水平ビームを通して発生する。図 1 は、液体溶液を収容し、キャップ 3 で開口頂端を閉じることができる商業的に購入できる容器 2 の一例を示してある。キャップ 3 は、容器内の溶液の蒸発を最少限にし、溶液がこぼれるのを防止する。容器 2 は透明な壁 4、6 を通して電磁線が透過できる平行に対向する透明な壁 4 および 6 と、検波器の中に液体を含んでいる。

典型的な光度実験では、容器 2 は垂直に配置し、容器 2 における溶液は矢印 7 の方向に示すように、壁 4 および 6 の表面に垂直な水平ビームで露光される。

幅 は、透明な壁 4 および 6 の内面間の距離に等しい。別の実施例では、電磁線に対する放射は垂直ビームを通して発生し、その場合に容器は水平に配置され、垂直ビームは対向する透明な壁に垂直であり、透過する。

20

【0015】

図 1 は、幅 で溶液を充填した容器を示す。別の実施例では容器は垂直ビーム光度で使用するために溶液量に変化してもよい。

図 2 は、少なくとも透明な底 14 を有する容器 2 で、溶液の量が変化し、視覚的に透明な対向する天井（図示しない）を有する容器の略図である。

底 14 に垂直でおよび矢印 17 の方向に透過する垂直ビームは容器 12 内の溶液を透過する。容器 12 における液体の深さは、溶液を通した光の幅である。例えば、容器におけるより多くのサンプル溶液を追加すると、溶液量が V_1 （固定線）から V_2 （点線）まで上昇することになり、溶液における対応する変化が ϵ_1 から ϵ_2 までの幅に現われる。より多くの液体は与えられた容器の中に、液体の柱の深さ、溶液によって透過したより多くの光の中に分配される。

30

測定した吸光から、幅は決定でき、液体の容量は決定する。

【0016】

より正確なために、測定した最大限の吸光は、ひとつの発色団、すなわち第 1 の発色団の吸光の最大限は第 2 の発色団の吸光の最大限と重ならない場合にだけ帰する。好適には、最大限の第 1 および第 2 発色団の吸光は、第 1 と第 2 の波長で発生し、別々に、各々の最大限の吸光は互いに最少限に重なり合わない。ひとつの実施例では、第 1 と第 2 発色団の吸光の最大限で少なくとも 10nm 異なる。

40

仮により正確さが要求されるならば、好適には第 1 の波長での第 2 発光団の吸光は、第 2 の波長での第 2 の発光団の吸光よりも約 10% 以上大きくなく、より好適には約 5% 以上も大きくなく、さらに好ましくは第 2 の波長での第 2 の発光団の吸光よりも約 2% 以上大きくないことである。これは第 1 の波長での最大限の第 1 発色団の吸光で第 2 発色団と最小限度の重なり合いを供給するものである。

図 2 は、溶液の頂部表面が平らである理想的な溶液量を示している。ここで、液量の計算は些細なことである。しかしながら実際には、マイクロ滴定量プレート液溜めのような小さな容器で、平らにならない液面を生じる液溜め容器の材質と相互に作用し合う。これは、購入できるマイクロ滴定量プレートおよび発色団の材質に共通する事実である。

50

【0017】

図3は、3つの可能なメニスカスの形状を示してある。図3Aは図2の理想的で平らなメニスカスを再現してあり、その場合にメニスカス23と容器22の側壁24の間における溶液の接触角は90度である。しかしながら、仮にプレートが(普通でない)あまり使用されないポリスチレン製である場合には、液体は水と同様に作用し、その時のメニスカスは凸状となる。図3Bにこの凸状のメニスカスが略図されており、その場合に、凸状のメニスカス25と側壁26の間における溶液の接触角は90度以上である。別の共通する状態では、仮に容器22の表面が親水性のある材料で形成されている場合には、液体は水と同様に作用し、その時のメニスカスは凹状となる。

10

図3Cは略図として凹状のメニスカス27と90度以下の値を有する側壁28との間における溶液の接触角を示してある。

凸状または凹状のメニスカスの場合に、容器の中央を介して透過する垂直ビームの幅は、メニスカスの形状に依存する。液溜めに入れる液体の量として、凸状のメニスカスはより長い幅を産出し、凹状のメニスカスはより短い幅を産出する。

このように、光学的手段による幅の測定に基づく容器における液体の量の計算はふたつの場合に異なる結果を与える。

平らな形状のメニスカスのずれで生じるエラーは非常に厳密で、たとえば20%以上の値のずれが生じることがある。

【0018】

20

従って、本発明のひとつの実施例では、検量の方法は、溶液における接触角が約80度～約100度までを維持していることを具備する。

接触角を維持することは、容器の材質や溶液の材料を選択することによって遂行され、溶液における少なくともひとつの成分でそれらを相互に作用することによって遂行される。溶液の成分は、多くの方法で接触角に影響する。水溶液における染色は接触角を実質的に90度以下になるようにする。

好ましくは、染色は接触角に最少限の歪みを生じさせるのに使用される。典型的な染色は、ポンソーSおよびアマランスを含んでいる。

ナトリウム塩化物のような塩が染色溶液に加えられた時には、接触角は増加する。

好ましくは、十分な塩の量は要望する接触角を生成するために加えられる。溶液pHを維持するために使用する緩衝液の選択は重要である。好ましくは、緩衝液は接触角が90度から最小限度のずれを生じさせる場合にだけ選択される。そのような緩衝液のひとつの分類はフタレート緩衝液(例えば、0.02M; pH6)であり、安定化pHである間、接触角が90度から最小限度のずれを生じさせるだけである。

30

【0019】

ひとつの実施例では、マイクロ滴定量プレート自体、要望する接触角を生成するために溶液成分と適合する材料を具備するために選択される。例えば、マイクロ滴定量プレートはポリスチレンのような材料を具備している。

別の実施例では、緩衝液はサンプル溶液の吸光が空気またはその他のガス状の環境に露光するので、サンプル溶液の吸光を安定させるのに選択される。

40

別の実施例では、より大きな正確さは実際の容器の形状を決定することによって得られ、また少なくとも正確にひとつの方向を測定することによって得られる。例えば、複数の液溜めのマイクロ滴定量プレートでは、各液溜めは円筒形状を有することが考えられ、各液溜めの横断面は図2における容器12によって略図が表されている。

このように、液量を計算する場合には、従来の方法は完全な円筒の方向を考えている。

しかしながら、実際には各液溜めはマイクロ滴定量プレートが金型を使用してプラスチックで成形されているので、先端を切ったような円錐形である。

この過程では、プラスチックは要望する形状や方向の金型の中に溶けて成形される。プラ

50

スティックが冷たくなれば、雌型は開き、部品を取り出せる。固まった部品をねじれなしで取り外させるようにするために、深さの特徴または窪みは部品をねじれないで取り外すことができるようにテーパまたは"抜き"勾配を有していなければならない。このように、マイクロ滴定量プレートの場合には、液溜めはその開口端に向っているより大きな場所で行くつかの角度範囲にまで角度がつけられている。完全な円筒である液溜めは、計算した量で5パーセントまでエラーを導くことができるというのは誤った憶測である。

【0020】

ひとつの実施例では、液溜めは完全な方向を有していることが憶測されない。円筒状容器または液溜めの例では、容器における溶液量が計算されると、液溜めにおけるテーパ角度または抜き角度が定まる。

10

別の実施例では、液溜めの直径は測定される。また別の実施例では、テーパの角度と直径の双方が測定される。好ましくは、これらの測定は0.5%を超えない正確さのレベルで行われ、好ましくは0.2%を超えない、さらに好ましくは0.1%を超えないものである。例えば、商業的に購入できる複数の液溜めを有するマイクロ滴定量プレートが使用された時、本発明の方法は測定方向によって与えられる先端を切ったような円錐形状の直径とテーパ角として実際の液溜めの形状を処理する。深さに充填する形状の液溜め量は、(2)の計算式による。

【0021】

【数2】

$$V_T = \pi l \frac{\phi^2}{4} + \pi \phi l^2 \frac{\tan(\gamma)}{2} + \pi l^3 \frac{\tan^2(\gamma)}{3} \quad (2)$$

20

【0022】

この場合に、 ϕ は底における液溜めの直径であり、また γ はテーパの半分の角度である。

別の実施例では、複数の液溜めプレートにおける個々の液溜めは、国家基準に適合する方法を使用して正確に測定される。従来の検量方法で作成された別の仮定は、プレートにおける各々の液溜めはひとつのプレートから次のプレートまで同じ方向であり、またはひとつのグループからまたはたくさんのプレートから次のプレートまで同じ方向である。実際には、金型の正常な状態で成形したプラスチック部品の方向に変化が生じる。例えば、金型およびプラスチックを金型に入れたときの溶かしたプラスチックの温度、部品が射出される前の金型における部品の冷却時間、金型の方向と同様に、金型成形前のプラスチック原料の混合内容による。

30

このような変化は、液溜め方向を高い正確なレベルに再生する能力を減少する。

【0023】

96液溜めプレート用の典型的な製造業者の方向仕様書は通常直径の1%以内ですべての液溜めの直径を提供する。しかしながら、液溜めの直径における1%のエラーは、測定した放出量に2%のエラーを生じさせる。ひとつの実施では、本発明の方法は、複数の液溜めを有するプレートの各液溜めは少なくとも0.5%を超えない正確なレベルでひとつの方向において測定され、好ましくは、0.2%を超えない、より好ましくは、0.1%を超えないことである。この方法では、プレートからプレートまでの変化のためのエラーは実質的に減少する。

40

ある溶液は、溶液濃度のため、発色団特性のため、または別の理由のため、ランベルト・ベールの法則から数パーセントまでずれているために、ランベルト・ベールの法則に従っていない。いくつかの発色団のためには、発色団の濃度範囲の選択だけが正確な吸光取りの結果を生じさせる。

そのような状態では、稀釈剤を変化させるいくつかのサンプルの測定吸光は、計算のために要求される。ひとつの実施では、ランベルト・ベールの法則に対する執着は仮定されず

50

、サンプル溶液のいくつかの希釈剤が準備されており、そのシステムが使用される時に予期される希釈剤の範囲を包含している。ひとつの実施例では、サンプル溶液は各サンプル溶液が少なくとも第1発色団の特徴ある濃度を表わす複数の溶液のうちのひとつである。

【0024】

吸光データの比率は2つの波長での複数のサンプルで取られる。その後、2つの波長での吸光データの比率はサンプル溶液の希釈剤の比に対して測定される。そのデータは少なくとも正方形の回帰分析によって決定される3つの係数と共に3次方程式に適合する。

この計算は以下にさらに詳細に説明する。

良好な光度読取りを得るためにサンプル溶液を希釈化することが必要な場合には、その後目的溶液もまたサンプル溶液用の希釈剤として作用するので、サンプル溶液の濃度に等しい濃度における第2発色団を含む目的溶液を有することが有益である。

第2発色団の濃度が一定に残っている間は、目的溶液でサンプル溶液を希釈化すると、第1発色団の濃度を低くする結果となる。適当な均等性にサンプル溶液と目的溶液を混合することは、正確な光度読取りが作成される点に液量を増加するのに役立つ。

説明した少なくともいくつかの選択は、一般にエラーに導く別の仮定を克服する。すなわち、仮にサンプルに含有している染料に加えて、希釈剤が液溜めに加えられたならば、それは検量の結果に影響を及ぼさない。しかしながら、少ない液量を検量する時は、液体は液溜めの底に一定に塗布せず、むしろ意味ある光量測定することが不可能である底で、液溜めの端にばらつく。典型的な実務では、確実に液溜めの底を覆う十分な液量を生じる希釈剤として作用するように追加の液量を生成することである。しかしながら、液溜めは先端がとがった円錐形状であることから、追加した希釈剤の量と吸光読取りとの間に直線の関係は全くない。加えて、ランベルト・ベールの法則を支持しないと、仮定する独自の液量くぼみが生じる結果となる。

また、希釈剤は実験される装置の放出と同じく確かでない検量をする放出装置を使用する場合に一般に追加される。

このように、1つの装置を検量する問題は解決されてないが、むしろ別の装置の問題に移管されている。

【0025】

一般に形成されている別の正しくない仮定は、マイクロ滴定量プレートにおける環境（例えば、空気）にそのまま露光した時に、実験室で用いる容器のような閉じた容器に含有されたとき、染料の吸光は同じであるということである。

最大量の有機染料はpHの変更に過敏であり、溶液が空気から炭素二酸化物を吸収した時に吸光を変更する。このように、別の実施例では、その方法は、意図した使用環境、例えば空気に露光した時に最小限度の吸光の変更を示す発色団を選択することを具備している。

溶液の温度は測定的に発色団の吸光に影響を与えるものである。典型的には、有機染料は温度変化としてそれらの発色団を変更する。別の実施例では、その方法は吸光の減少した温度の依存を示す発色団を選択することを具備している。好ましくは、温度依存は摂氏度毎に0.05%以下である。

この要求に適する典型的な発色団は、アマランス（Amaranth）とボンソーエス（Ponceau S）を含んでいる。仮により大きな正確さが要求されるならば、使用時点での試薬液の温度が測定され、その結果が計算される時に選択は検量アルゴリズムに適用される。

【0026】

本発明の別の観点は、液量を検量するためのシステムまたはキットを提供することである。そのキットはいくつかの部品を具備し、ユーザーに要求する液量をすばやく、容易な状態で検量することを許容している。

例えば、システムは先に記載した1またはすべての部品を具備している。ひとつの実施例

10

20

30

40

50

では、キットは複数のサンプル溶液と、第1の波長での最大限の吸光を提供する第1発色団および第2の波長での最大限の吸光を提供する第2発色団を具える各サンプル溶液と、少なくとも100nmになる第1および第2吸光の違いと、少なくとも第1発色団の特徴ある濃度を有する各サンプル溶液とを含んでいる。キットは、特別な要求する容量の希釈剤を伴うサンプル溶液のセットを具備することができる。例えば、仮にユーザーがナノリットルの範囲における液量を検量したいならば、キットはそのような範囲用のサンプル溶液のセットを使用するよう指示を含むことができる。仮にユーザーがマイクロリットルの範囲における液量を検量したいならば、ユーザーは指示されたとおり、異なるサンプルセットにその使用を変更する。

別の方法として、ユーザーは濃縮したサンプル溶液と目的溶液として同じ成分を有する希釈剤とを含有することができ、ユーザーに使用する適切な希釈剤を準備するよう指示する。好ましくは、サンプル溶液のすべては第2発色団の同じ濃度を含有している。

【0027】

キットは、第1の発色団および第2の発色団を離れて基準溶液または目的溶液を含むことができる。好ましくは、第2の発色団の濃度は、サンプル溶液における濃度と同じである。

またキットは正確に測定したサンプルホルダーまたは複数の検量用の複数の液溜め用マイクロ滴定量プレートを含むことができる。先に記載した実施例に従って、実際形状の精密な割り当てが計算され、また直径および/またはテーパの角度のような少なくとも一方向の正確な測定が行われる。

好ましくは、約0.5%を超えない正確なレベルに、また好ましくは、約0.2%を超えない正確なレベルに、さらに好ましくは約0.1%を超えない正確なレベルに測定される。好ましくは、これらのプレートにおける液溜めの物理的な方向は国家基準に適合する方法を使用する場合に測定される。

【0028】

またキットは、ハードウェアまたはコンピュータ読取可能なメディア、例えばフロッピーディスク、RAM、ROM、ハードディスク、光学材料等に格納したコンピュータの実行ソフトウェアで実行するアルゴリズムを含むことができる。

多くの異なるコンピュータ言語で同じアルゴリズムを表現することは可能であるし、適切な登録機および論理ゲートを接続するハードウェアの中にアルゴリズムを内蔵することさえも可能である。コンピュータプログラムは、検量結果における後の使用のためのデータを入力するために、または別の方法でデータの移動を容易にするためにユーザーに許諾しているユーザーインターフェイスとして使用することもできる。また、プログラムはユーザーに必要な行為を促し、またコンピュータファイルおよび/または印刷形式における眼に見える形式で結果を提供することもできる。

また、コンピュータプログラムは、そのプログラムがプレート読取器からデータを取得するプレート読取器または分光光度計を操作するように、他のコンピュータプログラムにインターフェイスを提供することもできる。

【0029】

アルゴリズムは、ユーザーからの入力、光度の読取結果、キット部品および検量プレートについて提供する情報、および/または他の自動または手動ソースから提供する情報に基づいて結果を計算する。

アルゴリズムを実行するために使用するソフトウェアは、多くのキット部品にデータを含み、入力データとして分光読取を受け入れ、液量の計算でこのデータを使用することができる。

ひとつの実施例では、多くのキット部品はコンピュータの中にスキャンまたは入力でき、計算用のソフトウェアによって読取ることができるバーコードで暗号化される。

そのような暗号化した情報は、サンプル溶液および/または目的溶液における発色団の1つのタイプまたは組み合わせタイプ、またはサンプル溶液および/または目的溶液における発色団の濃度を含有することができる。マイクロ滴定量プレートの個々の容器または個々の

10

20

30

40

50

液溜めは、与えられる液溜め用の実際の直径およびテーパの角度で暗号化できる。これらの寸法は、それ自体がプレートに適合し、プレートに印刷されるバーコードに記録されるか、またはこれらの寸法はキット指示書に供給され、ユーザーによって手動で入力され、または技術における通常的能力を有するユーザーに知られている他の入力方法によって手動で入力される。

【 0 0 3 0 】

ユーザーが検量工程を開始する時、ユーザーはバーコードを暗号化でき、または別の方法でアルゴリズムの計算によって使用されるコンピュータの中に情報を移動することができる。使用の時点でこのバーコードは読まれ、または情報は他の手段によってアルゴリズムの計算のために移動され、直径および/またはテーパの情報は計算で使用される。

10

別の暗号化した情報は、サンプル溶液および目的溶液の特性を含み、特にランベルト・ベールの法則から非線形性の範囲を測るそれらの特性を含んでいる。ひとつの実施例では、これらの特性は製造業者によって計算され、キットのユーザーに提供される。別の実施例では、キットは測定を実行するためにユーザー用の指示書およびこれらの特性を得るのに必要な計算を含むことができる。

ランベルト・ベールの法則から非線形性の範囲を測るためのひとつの実施例では、修正要素は分光方法における固有のエラーを正すために計算される。容器または複数の液溜めプレートは目方の量り、その後サンプル溶液が充填される。容器は再度目方を量り、目方の違いがサンプル溶液の重量である。サンプル溶液の重量から、サンプル溶液の量を計算できる。この同じサンプル溶液の分光が取られ、方程式(1)のランベルト・ベールの法則から、幅および容量を計算することができる。この容量と目方を量る方法によって決定した容量とを比較することにより、修正要素が計算される。この修正要素はキット指示書でユーザーに対し提供され、または特殊なサンプル溶液の特性として暗号化される。

20

【 0 0 3 1 】

先に記載したように、目的溶液は第2発色団だけを含んでいる。好ましくは、目的溶液はフタル酸緩衝剤のような適切で好適な緩衝剤の容量を含んでいる。ひとつの実施例では、製造業者は、製造時点で試薬剤を特徴づけるためにこの工程を実行する。これらの容量の結果はバーコード、または他の知られた方法を介してコンピュータプログラムに転送でき、キットに提供される。分光光度計はゼロとされ、目的溶液の分光は波長の範囲を超えて、最大限の分光の波長を正確に決定するために測定される。

30

波長の範囲は、最大限の分光を表わす第1発色団で、第1波長 λ_1 を含み、そして最大限の分光を表す第2発色団で、第2波長 λ_2 を含むべきである。ひとつの実施例では、目的溶液の分光は、400~800nmの範囲で測定される。最大限の目的溶液は、目的溶液のみが第2発色団を含有しているものとして、波長の数値 λ_2 で示される。好ましくは、目的溶液は、既に説明したように、数値 λ_2 での分光を10パーセントより大きくない数値を有する数値 λ_1 での分光を提供する。これは、サンプル溶液における第1発色団の最大限の分光を測定する場合に十分な誤りを防止する。

次の関係はランベルト・ベールの法則から得ることができる。

40

【 0 0 3 2 】

【 数 3 】

$$A'_{b1} = \epsilon'_{b1} c'_b l' \text{ at } \lambda_1 \quad (3)$$

【 0 0 3 3 】

【 数 4 】

$$A'_{b3} = \epsilon'_{b3} c'_b l' \text{ at } \lambda_3 \quad (4)$$

【 0 0 3 4 】

仮に製造業者が顧客または消費者に結果を提供するためにこの工程を実行するならば、主

50

要なマークは"基準分光光度計"としてここに言及した、製造業者の分光光度計に処理されるデータを示している。仮にユーザーがこれらの工程を実行するならば、主要なマークは全く意味がなく、削除できる。記号 b は測定される目的溶液に言及している。記号 " $'$ " は数値 1 での分光測定を表し、記号 " $'$ " は数値 3 での分光測定を表している。変数 $'$ は容量幅である。

キットは異なる液体の容量を検量するための希釈剤の範囲を変化させるサンプル溶液のセットを具備している。例えば、サンプル溶液はレンジ ビー (Range B) サンプル溶液とレンジ シー (Range C) サンプル溶液のセットを含むことができ、レンジ ビー (Range B) は10~50マイクロリットルの範囲における容量を検量するのに有益であり、レンジ シー (Range C) は2~10マイクロリットルの範囲における容量を検量するのに有益である。これらの範囲は典型的であり、技術における通知の能力を有する製造業者は、サンプル溶液用の他の容量範囲を決定することができる。キットは、既に準備したサンプル溶液のセットを含むことができ、好ましくは蒸発を防止するためにシールしたものを準備する。

【0035】

別の方法として、キットは濃縮サンプルと目的溶液として同じ部材を有する希釈剤とを使用される適切な容量の希釈剤を準備するためにユーザーに対する指示書と共に含むことができる。容量は分光光度計、典型的には $A < 2.5$ の範囲内に達するよう測定した分光を許容するために十分に希釈されるべきである。

希釈剤は、好ましくは4カ所のバランスのような重なりで形成される。希釈剤の比率 RD'_B は、サンプル溶液と目的溶液の容量の合計を分配したサンプル溶液の容量である。

【0036】

【数5】

$$RD'_B = \frac{V_B}{V_B + V_b} = \frac{w_B / \rho_B}{w_B / \rho_B + w_b / \rho_b} \quad (5)$$

【0037】

この場合に B と b はレンジ ビー (Range B) および空液量の比重のそれぞれを表している。レンジ シー (Range C) の希釈剤用に、多くの方程式で記号はCに変更される。好ましくは、異なる容量が検量される時に発生する異なる希釈剤に対応する各サンプル溶液用のいくつかの希釈剤がある。

これらの希釈剤は、2つの波長での基準分光光度計における適合した長さの容器に導くことができる。各々のサンプル溶液の分光スペクトルは、第1の波長での最大限の分光、すなわち2つの寄与の合計である 1 を提供する。

1 で分光を最大限有する第1発色団からの分光と、 2 で目的溶液の分光からの非常に小さい分光とである。この合計は方程式(6)に示してある。

【0038】

【数6】

$$A'_{B1} = \epsilon'_{B1}(RD'_B c'_B)' + \epsilon'_{b1} c'_b' \quad (6)$$

【0039】

この場合に、 c'_B は希釈していないレンジ ビー (Range B) 溶液における染料の濃度である。

希釈剤の比率 RD'_B による多層板 c'_B は希釈剤溶液における染料の濃度を与える。

この希釈剤で発色団 b (例えば、銅イオン) の濃度 c'_b は、目的溶液が溶液範囲を創作し、基準分光光度計における読取り用の溶液範囲を希釈化した時の双方に希釈剤として使用されて以来、目的溶液における発色団 b の濃度として同じであることを示す。

リージェント コンセントレーション ラティオ (RCR) は、第2発色団に関連して第1発色団の分光の濃度を特徴づけるのに使用できる。この比率は、方程式(7)に示される

10

20

30

40

50

。

【 0 0 4 0 】

【 数 7 】

$$RCR'_B = \frac{\varepsilon'_{B1} c'_B}{\varepsilon'_{B3} c'_b} \quad (7)$$

【 0 0 4 1 】

方程式 (3)、(5) および方程式 (7) に対する (6) を適用する場合、測定した品質の条件に表れた RCR を提供し、それは方程式 (8) に示される。

【 0 0 4 2 】

【 数 8 】

$$RCR'_B = \frac{A'_{B1} - A'_{b1}}{RD'_B A'_{b3}} \quad (8)$$

10

【 0 0 4 3 】

完全にランベルト・ベールの法則に従わない (非線形反応) 試薬液のシステムのために、RCR の数値はサンプル溶液のすべての稀釈剤のために十分ではない。いくつかの稀釈剤を測定することにより、線形のずれは、特性でき、修正要素に適用できる。

異なる稀釈剤用の異なる RCR 値は、 $RCR'_B (1)$ 、 $RCR'_B (2)$ 等に分類される。仮にこれらの RCR 値が稀釈剤の比率 RD'_B に対してグラフ化されるならば、データは二次方程式の形式で良く適合する。

【 0 0 4 4 】

【 数 9 】

$$RCR_B = RCR_B(0) [1 - a RD_B - b RD_B^2] \quad (9)$$

20

【 0 0 4 5 】

この場合に、 $RCR'_B (0)$ 、 a および b はテストデータに良い適合を与えるように常温が選ばれる。レンジ ビー (Range B) の現在のロット用に、常温は、

【 0 0 4 6 】

【 数 1 0 】

$$\begin{aligned} RCR_B(0) &= 27.0167 \\ a &= +0.14 \\ b &= -0.17 \end{aligned} \quad (10)$$

30

【 0 0 4 7 】

これらの 3 つの係数は、この試薬の特別ロット用にランベルト・ベールの法則からのずれを特徴づけ、試薬のロットが液体放出装置を検量するのに使われる時に計算結果に使用される。また、この情報は、コンピュータに入力するために、キットに提供されるサンプル溶液で暗号化でき、提供したソフトウェアで液体の容量を計算する上で使用できる。好ましくは、常温は試薬の各ロット用に再度数値が求められる。

ユーザーは、既に記載した多くの修正要素を得るために必要な寸法と計算を実行することができる。別の方法として、製造業者はこれらの工程を実行でき、キットの消費者に修正要素の結果を提供することができる。消費者は直ちに最初の寸法を実行することなしに、分光方法でこれらの修正要素を適用する。しかしながら、同じ吸光溶液用に、ユーザーの分光光度計は製造業者の分光光度計から得た吸光溶液として同じ結果を得られるということ推測できない。

40

例えば、製造業者はユーザーが分光分析法による垂直ビーム、すなわちプレート読取器で液体の容量を検量するのに反して、分光分析法による水平ビームを介して測定を実行する。ふたつの光度計の設計は、測定した分光に違いを提供する。プレート読取器は短い幅 (典型的に 1/2 cm またはそれ以下) のサンプルを通して短い時間に多くのサンプルの読取りを行えるようになっているか、分光光度計の水平ビームはより長い幅の読取 (より高い平行ビームを意味する) およびより正確な測定に向けて典型的により適応される。商業的に

50

購入できるプレート読取器は安価な値段の分光光度計の水平ビームと同じように、パラメータ用の良い仕様書を全く持っていない。3つの特別の問題は、

【0048】

1. 仮に光度計の光線ビームが完全に水平(すべての光線が平行であることを意味する)でなければ、光線は円錐状の光としてサンプルに出入する。完全な水平からのずれは、サンプルを通した光の有効な幅がサンプルの実際の物理的寸法よりも長いことを意味する。円錐角が広ければ広いほど、有効な幅は長くなる。このように、与えられたサンプルの測定した分光は、高く水平ビームを使用して測定した時よりも広い円錐の光線で光度計によって測定した時の方がより高い。プレート読取器は物理的レイアウトを得るための分光光度計よりもより広い円錐光線を有し、すばやく多くのサンプルを読取ることができるようにする必要性を持っていることは真実である。

10

2. 仮にサンプルが特有な有機染料のピーク吸光度、例えば80~100nm幅を有しているならば、その時、波長選択構造の正しい特性は、ピークの測定吸光を決定する。多くのプレート読取器は、波長選択構造として妨害フィルターを使用している。これらのフィルターは、分光光度計のバンドパスの妨害を何回も行うバンドパスを有している。またこれらのフィルターは、良く読取る分光光度計の中央波長の同程度の正確性を有していない。次の結果は、吸光読取は波長選択の詳細に基づいていることである。

【0049】

3. 中立濃度のフィルターを使用するプレート読取器および分光光度計の双方を吸光することは普通である。これらは広い波長の範囲を越えて等しく吸光することを意味する中間のグレー色を色付けするガラス板である。

20

それらの吸光は、国家基準に適合する結果で分光光度計で測定され、その後テストされるプレート読取器で測定される。これら読取の一致の程度は、プレート読取り結果の正確性的手段として使用される。しかしながら、中立濃度のフィルターによる検量工程は、バンド伝動外(波長選択構造を通してソースから通過する光線と要求する波長範囲ではないが検波器に対するサンプル)、波長選択の正確性、波長選択のバンドパス、またはバンドパス選択手段の伝動曲線の形のような商品についての情報を少しも、または全く与えないものである。これは、中立濃度のフィルターを使用した検量における独占的な依存が、それらの読取器がピーク分光の吸光を測定する時に、同じ設計の読取器でさえ、異なるプレート読取器の間における実質的な不一致(数パーセント)に達することを意味している。

30

設計におけるこれらの違いの結果は、分光光度計の水平ビームにおける適合する幅の容器で測定した染料溶液は、一般に開口するマイクロ滴定量プレートにおける垂直ビームプレート読取器で測定した時に、同じ吸光を有していない。

不一致はしばしば数パーセントになり、より大きくなることがある。

【0050】

このように、本発明のひとつの観点は、ユーザーの分光光度計またはプレート読取器、および製造業者の分光光度計または基準分光光度計で得た吸光測定間の修正要素を計算することである。この観点は、いかにプレート読取器によって作成した光度読取りが試液を特徴づけるために使用される基準分光光度計によって作成した光度読取りに関連するかを正確に決定するための修正方法を提供するものである。

40

この相関関係が作成されれば、修正はプレート読取器から読取りに適用される。

ひとつの実施例では、相関関係または修正要素を決定する方法は、特別の検量プレートの使用を含み、このプレートはプレート読取器と同様に基準分光光度計で読取るものである。検量板は試薬キット、すなわちサンプル溶液に供給する同じ溶液の異なる添加物を含有する適合する幅容器のような、一連のサンプルホルダーを具備している。

これらの検量物質は類似するピーク吸光度と試薬キットが液体の容量を検量するために使用される時に利用する場所と幅を有している。ひとつの実施例では、検量溶液はサンプル溶液のそれらに類似するピーク吸光度の場所と幅を有している。ひとつの実施例では、"類似"は各溶液における第1発色団の最大限の吸光に、また最大限の吸光媒体の約-10%

50

～約+10%までの範囲に言及している。同様に、ひとつの実施例では、"類似"は最大限の吸光媒体の約-10%～約+10%までの範囲(すなわち、最大限の吸光は、最大限の吸光媒体の±10%である)である各溶液における第2発色団の最大限の吸光に言及している。各々の第1および第2発色団用の"最大限の吸光媒体"は、複数の溶液またはサンプル溶液の媒体である。別の実施例では、各溶液における各発色団の吸光最大限は、約-5%～約+5%までの吸光媒体の最大限の範囲である(すなわち、媒体の±5%)。

【0051】

ひとつの実施例では、第1発色団が第1波長で0.5cm幅に約0.1～約3の範囲にある吸光度ピークを有している。別の実施例では、第2発色団が第2波長で0.5cm幅に約0.1～約1.5の間の吸光度ピークを有している。

10

ある実施例では、各サンプル溶液はさらに少なくともひとつの凍結防止剤を具備している。ある実施例では、その少なくともひとつの凍結防止剤は、メチルスルホキシド、イソプロパノール、メタノール、プロピレングリコールおよびエチレングリコールから選択される。ある実施例では、その少なくともひとつの凍結防止剤は、サンプル溶液の全体の容量に関して、約40%～約98%の容量の範囲で濃度を有している。

このようにプレート読取器(波長選択手段の正確性およびバンド幅、バンド伝動外、光線ビームの水平、および検出反応の線形性と電気的読取手段)は実験される。プレート読取器と基準分光光度計間の不一致は十分にかつ確かに修正できる。

20

【0052】

図4は検量板50の一実施例を示す概略図である。検量板50は、一連のサンプルホルダーまたは容器54を保持するハウジングまたはケーシング52を含んでいる。

ケーシング52は1つの容器を別の容器から離すスペーサー56を含んでいる。この実施例において、サンプルホルダー54は図1に示した容器であり、適合した幅を供給している。各容器は溶液を通して光が透過するように対向して平行する透明な側壁を有している。側壁62はここに示されていない別の側壁に平行している。技術における通常的能力を有する者は、一連のサンプルホルダーで検量板の別のデザインを容易に描くことができる。既に記載したように、各サンプルホルダー54は第1および第2発色団を有するサンプル溶液を含有している。溶液は蒸発を防ぐためにキャップ58によってサンプルホルダー54を覆ってある。好ましくは、各液体の溜めは、さらにサンプル溶液の発泡を許容するために空気泡を含んでいる。容器は、好ましくは電磁線、すなわちキャップ58に隣接する領域に露光しない領域に移動する泡を生じるように設計されている。

30

更に特別に、ガラスまたは水晶物質の容器にテフロン剤を使用してもよい。容器を垂直に配置した時、空気泡は次の理由のためのテフロン剤に隣接して残存する。仮に空気泡がテフロン剤に隣接する領域を離れようとする、その時空気泡の一端は、その他端がテフロン剤と接触している間、容器のガラスまたは水晶と接触する。

液体と固体の接触面間の接触角は、テフロン剤と液体の接触面よりもガラスと液体の接触面の方がより小さくなる(90度以下)。

液体の表面張力は、好ましくは空気泡の両端が再度テフロン剤と接触するまで、テフロン剤に向かって空気泡を引っ張る。このように、空気泡はテフロン剤に"粘着"する。ある実施例では、検量盤50は少なくとも1つの中立濃度のガラスフィルターを有している。

40

【0053】

本実施例における検量盤50は、水平ビームの分光光度計によって読取り可能に設計されており、検量盤は図4に示すように垂直位置に支持されている。他の手段として、検量盤は、水平位置に支持した時、垂直ビームの分光光度計によって読取り可能に設計されている。

検量方法では、各サンプルは基準の分光光度計が国家基準に適合する数値を供給する正確さが知られた分光光度計(基準分光光度計または製造業者の分光光度計)で測定される

50

これらの数値は検量盤自体に、または他の知られた方法により、印刷され、付着されるバーコードを介して記録または暗号化される。

ユーザーが検量工程を始める時、最初にユーザーはバーコードをスキャンするか、その他の方法で検量アルゴリズムによって使用するためのコンピュータの中に検量盤に関連した情報を移す。その後、検量盤はユーザーのプレート読取器で読み取られる。このように、ユーザーのプレート読取器は基準の分光光度計に対して検量される。ある実施例では、検量盤における溶液は、上記に記載した試液キットに使用したような同じ発色団を含有する液体である。

このように、プレート読取器は、液体放出の検量工程のその後の工程を測定するように、同じ物質を正確に読取るよう検量できる。

10

【 0 0 5 4 】

ある実施例では、検量盤は濃度が変化する第 1 の液体セットを具備している。この実施例では、例えば 4 つの異なる濃度の検量液体を検量盤によって例証している。

これらの液体は、記号 C A L を伴う下記の方程式に分類される。

製造業者は、例えば、各々が λ_1 で $A'_{CAL1}(n)$ 、 λ_3 で $A'_{CAL3}(n)$ の結果である第 1 の検量溶液の吸光を測定する。第 1 検量溶液を書き改めたランベルト・ベールの法則は、

【 0 0 5 5 】

【 数 1 1 】

$$\begin{aligned} A'_{CAL1}(1) &= \varepsilon'_{CAL1}(1) c'_{CAL1}(1) l_{CAL}(1) \quad \text{at } \lambda_1 \\ A'_{CAL3}(1) &= \varepsilon'_{CAL3}(1) c'_{CAL3}(1) l_{CAL}(1) \quad \text{at } \lambda_3 \end{aligned} \quad (11)$$

20

【 0 0 5 6 】

検量バイアルのひとつは目的溶液で充填され、 $A'_{CAL1}(b)$ および $A'_{CAL3}(b)$ の吸光結果はランベルト・ベールの方程式に従事している。

【 0 0 5 7 】

【 数 1 2 】

$$A'_{CAL1}(b) = \varepsilon'_{CAL1}(b) c'_{CAL1}(b) l_{CAL}(b) \quad (12)$$

30

【 0 0 5 8 】

【 数 1 3 】

$$A'_{CAL3}(b) = \varepsilon'_{CAL3}(b) c'_{CAL3}(b) l_{CAL}(b) \quad (13)$$

【 0 0 5 9 】

ユーザーがプレート読取器で第 1 検量溶液を測定すると、次のような関係が得られる。

【 0 0 6 0 】

【 数 1 4 】

$$\begin{aligned} A_{CAL1}(1) &= \varepsilon_{CAL1}(1) c_{CAL1}(1) l_{CAL}(1) \quad \text{at } \lambda_1 \\ A_{CAL3}(1) &= \varepsilon_{CAL3}(1) c_{CAL3}(1) l_{CAL}(1) \quad \text{at } \lambda_3 \end{aligned} \quad (14)$$

40

【 0 0 6 1 】

第 1 検量溶液の 2 つの器具における 2 つの波長での読取比率は、

【 0 0 6 2 】

【 数 1 5 】

$$CALR(1) \equiv \frac{\varepsilon'_{CAL1}(1) c'_{CAL1}(1) \varepsilon_{CAL3}(1) c_{CAL3}(1)}{\varepsilon'_{CAL3}(1) c'_{CAL3}(1) \varepsilon_{CAL1}(1) c_{CAL1}(1)} \quad (15)$$

【 0 0 6 3 】

【数 16】

$$CALR(1) = \frac{A'_{CAL1}(1) A_{CAL3}(1)}{A'_{CAL3}(1) A_{CAL1}(1)} \quad (16)$$

【0064】

この比率は、いかにユーザーのプレート読取器が与えられる検量溶液を読取るかと、いかに製造業者のまたは基準の分光光度計が検量溶液を読取るかとの比率を表している。4つの比率は、CALR(1)、CALR(2)、その他として分類した4つの異なる各々の検量溶液について得られる。

仮にこれらのCALR数値が₁でのプレート読取器で測定したような吸光に対してプロットされるならば、直線が結果である。このように、₁で与えられる吸光のために、使用するための修正CALRは線状の回帰線を見つけることによって得られる。他の実施例では、異なる数（より以上またはより少数）の検量溶液が使用される。

10

検量器を充填した目的溶液の読取りは $A_{CAL1}(b)$ および $A_{CAL3}(b)$ であり、次の関係を供給する。

【0065】

【数 17】

$$A_{CAL1}(b) = \varepsilon_{CAL1}(b) c_{CAL1}(b) l_{CAL}(b) \quad (17)$$

【0066】

【数 18】

$$A_{CAL3}(b) = \varepsilon_{CAL3}(b) c_{CAL3}(b) l_{CAL}(b) \quad (18)$$

20

【0067】

この場合に、 $l_{CAL}(b)$ は検量器を充填した目的溶液を使用する容器の幅である。

2つのシステムにおける₃で得た空検量読取の比率は方程式(19)に示すとおりである。

【0068】

【数 19】

$$CALR_3(b) = A'_{CAL3}(b) / A_{CAL3}(b) \quad (19)$$

30

【0069】

その後、ユーザーはプレート読取器で₁および₃での検量盤を測定し、吸光の数値は次のように与えられる。

【0070】

【数 20】

$$A_1 = \left(\varepsilon_{B1} c_B \frac{V_S}{V_T} + \varepsilon_{b1} c_b \right) l \quad (20)$$

【0071】

および

【0072】

【数 21】

$$A_3 = \varepsilon_{b3} c_b l \quad (21)$$

40

【0073】

この場合に、 l は測定される液体の溜め部の幅であり、 V_S はサンプルの容量、そして V_T は液体の溜め部における液体の全体の容量（サンプル溶液プラス目的溶液）である。

を説明する方程式(21)を示す。

【0074】

50

【数 2 2】

$$l = \frac{A_3}{\varepsilon_{b3}c_b} \quad (22)$$

【0 0 7 5】

の明白な数値を得るために、基準の分光光度計とプレート読取器間の異なる読取の補正がされなければならない。

この補正は方程式(19)の検量比率から得られる。それを使用すれば、方程式(4)の目的溶液の特徴の結果は次に示すとおりである。

【0 0 7 6】

【数 2 3】

$$l = l' \text{CALR}_3(b) \frac{A_3}{A'_{b3}} \quad (23)$$

10

【0 0 7 7】

は、いかに多くの液体が実際に容器の中に分配されたかによって、各々の容器(本質的に)は異なる。

各容器における液体の全体の容量は、方程式(22)によって与えられたような測定した幅および容器の寸法に基いて計算される。

ここで容器は円錐状の直径と半分の角度で先端がとがっている。深さに充填した与えられた容器における全体の容量 V_T は、次に示すとおりである。

20

【0 0 7 8】

【数 2 4】

$$V_T = \pi l \frac{\phi^2}{4} + \pi \phi l^2 \frac{\tan(\gamma)}{2} + \pi l^3 \frac{\tan^2(\gamma)}{3} \quad (24)$$

【0 0 7 9】

各々の容器に加えたサンプルの容量 V_S は、その後、方程式(20)で始まり、 V_S を解決する。

【0 0 8 0】

【数 2 5】

$$A_1 - \varepsilon_{b1}c_b l = \varepsilon_{B1}c_B \frac{V_S}{V_T} l \quad (25)$$

30

【0 0 8 1】

【数 2 6】

$$V_S = V_T \left(\frac{A_1 - \varepsilon_{b1}c_b l}{\varepsilon_{B1}c_B l} \right) \quad (26)$$

【0 0 8 2】

を除去するに方程式(21)の使用は、次のことを供給する。

【0 0 8 3】

【数 2 7】

$$V_S = V_T \left(\frac{A_1 - A_3 \frac{\varepsilon_{b1}c_b}{\varepsilon_{b3}c_b}}{A_3 \frac{\varepsilon_{B1}c_B}{\varepsilon_{b3}c_b}} \right) \quad (27)$$

40

【0 0 8 4】

A_3 によって方程式(27)の括弧における条件を割り算するならば、また試液濃度の比率 RCR'_B (方程式7)を適用するならば、次のような関係が生じる。

【0 0 8 5】

【数28】

$$V_s = \frac{V_T}{RCR_B} \left(\frac{A_1}{A_3} - \frac{\varepsilon_{b1} c_b}{\varepsilon_{b3} c_b} \right) = \frac{V_T}{RCR_B} \left(\frac{A_1}{A_3} - \frac{A_{CAL1}(b)}{A_{CAL3}(b)} \right) \quad (28)$$

【0086】

この方程式に関する限り、全ての吸光は、ユーザーのプレート読取器で作成された測定に言及する。

試液濃度の比率の場合には、プレート読取器によって測定されるデータは全くない。しかしながら、先に測定したCALR数値は、仮にRCRを測定するのに使用されているとしたら、ユーザーのプレート読取器が読取ったであろうデータにデータを発生する基準の分光光度計を加工するのに使用することができる。

10

【0087】

【数29】

$$RCR(\text{corrected}) = RCR'_B / CALR \quad (29)$$

【0088】

知られてないサンプル容量の結果は、方程式(30)で表される。

【0089】

【数30】

$$V_s = \frac{V_T \cdot CALR}{RCR'_B} \left(\frac{A_1}{A_3} - \frac{A_{CAL1}(b)}{A_{CAL3}(b)} \right) \quad (30)$$

20

【0090】

CALRはプレート読取器で測定したように、 A_1 での吸光 A_1 の機能である。

RCR_B は、方程式(9)で与えられたように、ダイリュージョンラティオ(Dilution Ratio)(この場合 $RD_B = V_S / V_T$)の機能である。このように、 RCR_B の数値は必要であるので、 V_S は直接に計算できず、それ自体 V_S に従う。成功する近似は V_S を計算するために使用できる。 RCR_B の主要値を得るために、 V_S の推測地(ピペットがマークされているのは何か、または概算値)は、方程式(9)において RD_B の最初の推測値としての全体の容量 V_T によって割り算される。この概算値 RCR_B を使用するならば、 V_S の計算は方程式(30)で遂行される。得られた V_S の新しい値は、 RD_B の概算値を正確にするために使用され、そして新しい値 RD'_B は新しい値 RCR_B を計算するために使用され、 V_S 値を正確にするために使用される。

30

【0091】

実施例

この実施例は、基準溶液およびサンプル溶液の配合物を提供し、正確な吸光測定を得るのに必要なものとして稀釈化することができる。

目的溶液。目的溶液は、4.564g(グラム)の酸化塩化物二水和物、15.186gEDTA(エチレンジアミン四酢酸、テトラソジウム塩)、酸化用キレート化剤、および4L(リットル)の稀釈剤における6.953gカリウム水素フタル酸)を分解して生成される。必要な場合にだけ加熱する。pHは実験され、 6.0 ± 0.1 使用1N(通常)NaOH(約21ミリリットル)に近づける。溶液は0.45ミクロンフィルターを通して強くキャップしたガラスビンの中に入る。

40

目的溶液の特別の比重は、比重びんを使用して測定する。吸光は1センチメートルの容器を使用している基準の分光光度計で測定され、その容器(または少なくとも内部壁部、例えば上塗り)はポリスチレン製である。

基準の分光光度計は、容器における0.02M(モル)でゼロにセットしてある。

スリット幅1ナノメートル(nm)で400~800ナノメートル(nm)スキャンは、0.2秒毎に読取を実行する。最大限のピーク吸光度は、およそ730ナノメートル(nm)で観察されるべきである。その後、700~750ナノメートル(nm)のスキャンは、スリット幅0.2ナノメートル(nm)で1秒毎に読取りが行われる。その後、スリットは4ナノメートル(nm)にセットされ、読取

50

時間は5秒にセットされる。

吸光は520ナノメートルおよび730ナノメートル(nm)で測定される。

【 0 0 9 2 】

吸光は1センチメートル容器0.003以内において0.610にすべきである。

仮に非常に高いバッチ測定ならば、目標範囲内に吸光を減少するために脱イオン水が追加される。

仮に非常に低いバッチ測定ならば、目標範囲内に入るように少量の目的溶液（数パーセントより多くない容量）が追加される。

レンジシー（Range C溶液）この溶液の520ナノメートル(nm)での目標とする吸光は、1センチメートル幅の容器に75である。アマランス（Amaranth）1.888グラムは、上記準備した目的溶液100グラムに分解され、その結果、溶液は0.47ミクロンフィルターを介してろ過され、そして暗がりにある堅くキャップした茶色のガラスビンに貯蔵される。

1グラムのレンジシー（Range C）溶液は、30グラムの目的溶液で希釈化される。この溶液は4つの場所のバランスに重りをかけ、正確な重さは記録される。目方を量っている間には最少限の振動、通風、静電気および蒸発に注意する。いくつかのガラスビンは希釈溶液で充たされる。これらの溶液はキャップされ、基準の分光光度計のサンプル区分室に平衡される。

溶液の温度は記録される。基準の分光光度計は、0.02M緩衝液でゼロである。400ナノメートル（nm）から800ナノメートル（nm）までのスキャンは、1ナノメートル（nm）スリット幅と0.2秒読取時間を使用して行われる。吸光は520および730ナノメートル（nm）でしるされる。その後、520および730ナノメートル（nm）での吸光は、4ナノメートル（nm）スリット幅および5秒の読取時間である、前進した読取（Advanced Reads）を使用することによって測定される。

レンジビー（Range B）溶液。520ナノメートル（nm）での目標とする吸光は、1センチメートル幅の容器では17.86である。上記記述として準備したレンジシー（Range C）溶液、312.5グラムは1000グラムの目的溶液に加えられる。

その結果である溶液は、0.47ミクロンフィルターを介して混合され、ろ過され、そして暗がりにおける堅くキャップした茶色のガラスビンに貯蔵される。

【 0 0 9 3 】

レンジビー（Range B）溶液、5グラムは30グラムの目的溶液で希釈化される。この溶液は、4つの場所のバランスに重りをかけ、正確な重さは上記に記載した環境の下で記録される。いくつかのガラスビンは希釈した溶液で充たされる。これらのビンは、キャップされ溶液は分光光度計のサンプル区分室に平衡されることが許容される。溶液の温度は記録される。

分光光度計は0.02M緩衝液でゼロである。

400ナノメートル（nm）から800ナノメートル（nm）までのスキャンは、1ナノメートル（nm）スリット幅と0.2秒の読取時間を使用して行われる。吸光は520および730ナノメートル（nm）でしるされる。その後、520および730ナノメートル（nm）での吸光は、4ナノメートル（nm）スリット幅および5秒の読取時間である前進した読取（Advanced Reads）を使用することによって測定される。

本発明のこれらおよび他の実施例、いかに記載する請求の範囲内に含まれる。

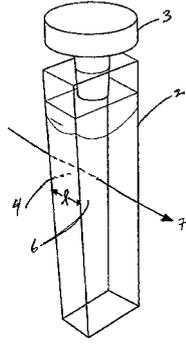
10

20

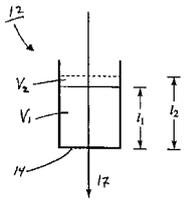
30

40

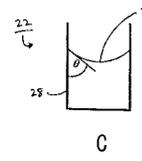
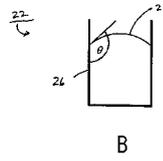
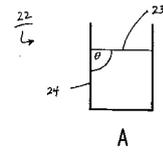
【図1】



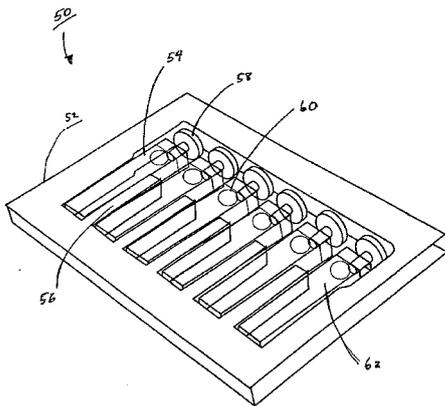
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特表平07-507135(JP,A)
特開平07-072086(JP,A)
米国特許第05766875(US,A)
米国特許第05258308(US,A)
米国特許第04354376(US,A)
特開2002-228587(JP,A)
特開2000-035401(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01F 23/28
G01N 21/78
G01N 21/03
G01N 21/27