



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT

70086

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 12 09 1986

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ G 01 N 21/01

SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökning	842120
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	25.05.84
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	25.05.84
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	01.12.84
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.86
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	30.05.83
Suomi-Finland(FI) 831936	

(71) Labsystems Oy, Pulttitie 9, 00810 Helsinki, Suomi-Finland(FI)

(72) Hannu Harjunmaa, Espoo, Suomi-Finland(FI)

(74) Ruska & Co Oy

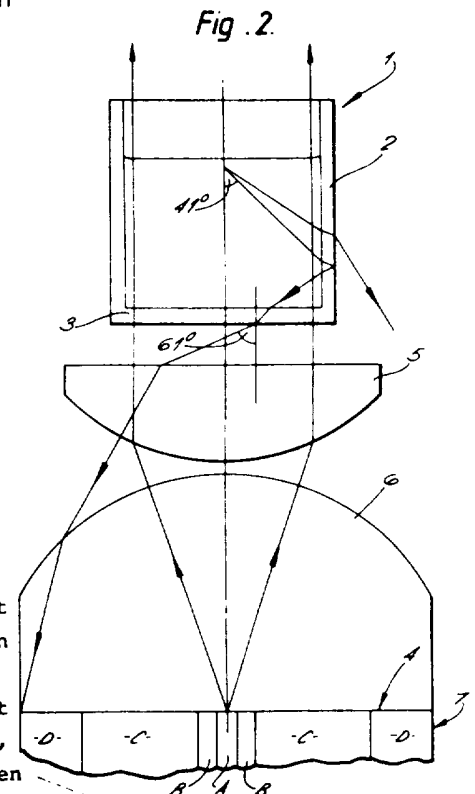
(54) Laitteisto ja menetelmä fluoresenssin, sameuden, luminesenssin tai
absorption mittaamiseksi - Anordning och förfarande för mätning av
fluorescens, turbiditet, luminescens eller absorption

(57) Tiivistelmä

Laitteisto nestenäytteen fluoresenssin, luminesenssin, sameuden ja absorption mittaamista varten, jossa näyte on lieriömäisessä, läpinäkyvällä pohjalla varustetussa kyvetissä ja valo johdetaan kyvetiin optisten kuitujen avulla pitkin kyvetin keskiakselia. Laitteistoon kuuluu lisäksi optinen systeemi, jonka optinen akseli yhtyy kyvetin keskiakseliin, sekä valonilmaisim. Olennaista laitteistossa on, että olennaisesti yhtä suuri osuus jokaisesta näytteen tilavuusalkiosta lähtevästä valosta kerätään ilmaistavaksi kyvetin seinämien kokonaisheijastuksen avulla optisen systeemin kautta valonilmaisimelle ja että optinen systeemi kollimoii myös kyvetiin johdettavan valon.

(57) Sammandrag

Anordning för mätning av fluorescensen, luminescensen, grumligheten och absorptionen hos ett vätskeprov, vari provet befinner sig i en cylindrisk kuvett med genomskinligt botten och ljuset ledes till kuvetten medelst optiska fibrer utmed kuvettens mittaxel. Till anordningen hör dessutom ett optiskt system, vars optiska axel sammanlöper med kuvettens mittaxel, samt en ljusindikator. Det väsentliga i anordningen är, att en väsentligen lika stor andel av det ljus som emitteras från varje volymentelement i provet uppsamlas för indikering med tillhjälp av kuvettväggarnas totala reflektion via det optiska systemet till ljusindikatorn och att det optiska systemet även kollorar det ljus som skall ledas till kuvetten.



Laitteisto ja menetelmä fluoresenssin, sameuden,
luminesenssin tai absorption mittaamiseksi

5 Keksintö kohdistuu laitteistoon, jolla voidaan mitata
sekä fluoresenssia, sameutta, luminesenssiä että absorptio-
ta nestenäytteistä.

10 Ennestään tunnetaan useita erilaisia laitteita neste-
näytteen fluoresenssin, sameuden, luminesenssin tai absorp-
tion mittaamiseksi erikseen. Tunnetaan myös joitakin lait-
teita, joissa kaksi tai useampia edellä mainituista toimin-
noista on yhdistetty. Tällöin missään mittauksessa ei kui-
tenkaan ole voitu saavuttaa niin hyvää suorituskkyä kuin
yhtä mittausta varten vartavasten suunnitellulla laitteella.

15 Tässä yhteydessä on tunnettua käyttää myös hyväksi ky-
vetin sisäistä kokonaisheijastusta. Esimerkiksi hakemus-
julkaisusta DE 3 122 896 tunnetaan laite, jossa valonsäde
kulkee vaakasuoraan virtaavaa näytettä täynnä olevan kam-
mion läpi ja jossa absorbanssia mitataan kokonaisheijastus-
ta hyväksikäyttäen. Tässä laitteessa on erikoista se, että
mittausastian seinämän taitekerroin on pienempi kuin mitat-
20 tavan nesteen, jolloin kokonaisheijastus tapahtuu astian
sisäpinnasta.

 Fotometrinen mittaus näytteen läpi pystysuoraa valonsä-
dettä hyväksikäyttäen on tunnettu esimerkiksi patenttijul-
kaisusta FI 57665 ja FI 55093.

25 Nyt esillä olevan keksinnön tarkoituksena on aikaansaa-
da laite, jonka suorituskky kaikissa mittauksissa on huip-
puluokkaa ja erityisesti fluorometriassa olennaisesti pa-
rempi kuin tavanomaisilla laitteilla.

30 Keksinnön tarkoitus aikaansaadaan patenttivaatimuksissa
esitetyin keinoin. Keksinnön mukaisessa laitteessa tutkittava
näyte sijaitsee kyvetissä, jonka seinämämateriaalin taite-
kerroin on suurempi kuin sekä mitattavan nesteen että ympäröi-
vän väliaineen. Kyveti on lieriön muotoinen ja sen kahdesta

lieriön akselia vastaan kohtisuorassa olevasta päästä toinen on avoin ja suunnattu ylöspäin. Lieriön pohja on läpinäkyvä. Pääosa laitteen optiikasta sijaitsee kyvetin alla. Välittömästi kyvetin alla on linssisysteemi, johon on jäykästi kiinnitetty optinen kuitukimppu. Kyvetin keskiakseli, linssisysteemin optinen akseli ja kuitukimpun pääns keskiakseli yhtyvät. Kuitukimpussa on neljä vyöhykettä: pyöreä keskivyöhyke, kaksi rengasmaista ulkovyöhykettä sekä rengasmaisen välivyöhyke keskivyöhykkeen ja ulkovyöhykkeiden välissä. Välivyöhyke ei sisällä optisia kuituja. Keskellä oleva kuituvyöhyke johtaa valon valonlähteestä kyvetille. Ulompia kuituvyöhykkeitä käytetään kyvetistä tulevan valon johtamiseen valonilmaisimelle.

Linssisysteemin tehtävänä on kollimoida keskivyöhykkeestä lähtevä valo siten, että olennaisesti koko näyte tulee valaistuksi kyvetin seinien suuntaisilla valonsäteillä. Linssisysteemin tehtävänä on myös kerätä kyvetin pohjan alueelta tiettyä rajakulmaa pienemmässä kulmassa kyvetin keskiakseliin nähden lähtevä säteily ulkovyöhykkeisiin.

Edellä mainitun rajakulman on oltava pienempi kuin 61° kyvetin akselistä laskettuna; suurin valonkeräystehokkuus saavutetaan kulman ollessa 61° .

Keksinnön mukaisen laitteen kaksi tärkeintä etua ovat se, että näyte tulee valaistuksi tasaisesti sekä se, että näytteen säteilemästä valosta tulee johdetuksi ilmaisimelle yhtä suuri osuus näytteen jokaisesta kohdasta. Fluorometriassa ja nefelometriassa molemmat edut ovat laitteen toiminnalle olennaiset. Luminometriassa, jossa näytettä ei valaista, valaisun tasaisuudella ei ole merkitystä. Näissä kolmessa mittaustavassa, ja ennestään tunnetulla tavalla absorptiomittauksessa, ovat siis voimassa tunnetut pystysuoran mittauksen edut: Mittauksen tulos riippuu pelkästään mitattavan aineen kokonaismäärästä kyvetissä, eikä olleenkaan liuottimen määrästä tai mitattavan aineen mahdollisesti tasaisesta poikkeavasta jakaumasta kyvetin pystysuunnassa; mittauksen herkkyyttä voidaan säätää muuttamalla nestemäärää kyvetissä; kts. esim. Suovaniemi, O., "Perform-

ance and properties of the Finnpiquette Analyzer System",
 Proceedings of the Second National Meeting on Biophysics
and Biotechnology in Finland, Kairento, A.L., Riihimäki, E.
 and Tarkka, P., Eds., pp. 183-187 (1976), ja Suovaniemi, O.,
 5 Järnefelt, J., "Discrete Multichannel Analysis Systems",
International Laboratory, April 1982 (ja American Labora-
tory, June 1982).

Lisäksi keksitty laitteisto soveltuu hyvin myös mikro-
 palloihin kiinnittyneen fluoresoivalla aineella merkityn
 10 vasta-aineen mittaukseen.

Seuraavassa esitetään erään esimerkinomaisen, kuvien 1
 ja 2 mukaisesti toteutetun laitteen toiminta fluorometrias-
 sa, luminometriassa, nefelometriassa ja absorptiometriassa.

Mainittu rajakulman arvo perustellaan seuraavasti (ks.
 15 kuva 2): Mistä tahansa nestenäytteen osasta yli 41° kul-
 massa kyvetin 1 akseliin nähden lähtenyt säteily poistuu
 kyvetistä sen sivuseinämän 2 kautta. Alle 41° kulmassa ky-
 vetin akseliin nähden lähtenyt säteily kokee kokonaishei-
 jastuksen ja jatkaa etenemistä kyvetin sisällä suuntakul-
 20 man itseisarvon pysyessä muuttumattomana. Jos nyt 41° kul-
 massa liikkuva juuri ja juuri kokonaisheijastunut valonsä-
 de tavoittaa kyvetin pohjan 3, niin se Snelliuksen lain mu-
 kaisesti muuttaa suuntakulmaansa siten, että se tasapohjai-
 sen kyvetin alapuolisessa ilmatilassa on 61° . Annetut kul-
 25 ma-arvot pitävät paikkansa kun näytteen taitekerroin on
 1,33. On huomattava, että jos kyvetin seinämä ja pohja
 ovat tasapaksut, ne eivät vaikuta mainittuihin suuntakul-
 miin, vaikka niiden taitekerroin olisikin suurempi kuin
 1,33. Jokainen suuntakulma välillä $0^\circ \dots 61^\circ$ vastaa tiet-
 30 tyä poikittaista etäisyyttä linssisysteemin polttotasossa 4
 olevan kuitukimpun pään keskipisteestä.

Fluorometriassa keskimmäistä kuituvyöhykettä A pitkin
 kulkeva eksitaatiovalo kulkee linssien 5 ja 6 läpi ja muo-
 dostaa sen jälkeen yhdensuuntaisten valonsäteiden kimpun,
 35 joka valaisee kyvetin sisällön tasaisesti ja on siten ra-
 jattu, että kyvetin pystyseinämät eivät tule valaistuiksi.
 Osa eksitaatiovalosta heijastuu takaisin linssien pinnois-

ta ja kyvetin pohjan sisä- ja ulkopinnasta sekä nesteen vapaasta pinnasta. Niistä pinnoista, jotka eksitaatiovalonsäde leikkaa kohtisuorasti, se heijastuu takaisin lähtökoh- taansa. Koska vyöhyke A ei ole pistemäinen valonlähde, osa
5 heijastuneesta valosta osuu sen ulkopuolelle. Väliwyöhyke B on suojavyöhyke, jonka ulkosäde on esimerkiksi kolme kertaa suurempi kuin vyöhykkeen A. Ne kohtisuorista pinnoista heijastuneet säteet, jotka eivät osu vyöhykkeeseen A, osu- vat vyöhykkeeseen B eivätkä joudu siihen kuitukimpun 7
10 osaan, josta emissio mitataan. Jos näyte fluoresoi, niin siitä emittoituu kaikkiin suuntiin valoa, jonka aallonpi- tuus on suurempi kuin eksitaatiovalon. Kyvetin pystyseinä- mistä tapahtuva kokonaisheijastus aiheuttaa sen, että jo- kainen valonsäde, jonka suuntakulma näytteen sisällä kyve-
15 tin akselin alaspäin osoittavasta suunnasta mitattuna on pienempi kuin 41° , poistuu näytteestä kyvetin pohjan 3 kautta. Kun valonsäde siirtyy näytteestä ilmaan, sen suun- takulma suurenee siten, että säteen, jonka suuntakulma näytteessä on 41° , suuntakulma ilmassa on 61° . Linssit
20 taittavat kaikki niihin osuvat valonsäteet, joiden suunta- kulma on pienempi kuin 61° , kuitukimpun päässä olevaan polttotasoon. Polttotasossa emissiovalo siirtyy ulkvyö- hykkeissä C ja D oleviin kuituihin ja niitä myöten valonil- maisimelle.

25 Luminometriassa näyte emittoi valoa kemiallisen reak- tion vaikutuksesta. Laite kerää emittoituneen valon ja johtaa sen valonilmaisimelle täsmälleen samalla tavalla kuin fluorometriassa. Ainoa ero on siis se, että lumino- metriassa valonlähde ei ole toiminnassa.

30 Nefelometriassa mitataan näytteessä olevien kiinteiden hiukkasten sirottamaa eli suunnastaan poikkeuttamaa valoa. Valon lähteenä nefelometriassa käytetään joko samaa valon- lähdettä kuin fluorometriassa tai kyvetiin sen keskiakse- lia pitkin ylhäältä tulevaa valonsädettä, kuten esim. la-
35 sersädettä. Jälkimmäisessä tapauksessa valonsäde osuu ky- vetin ja linssin läpi kuljettuaan kuituvyöhykkeeseen A. Si- ronnut valo mitataan vain kuituvyöhykettä D käyttäen. Sii-

hen osuvat vain ne valonsäteet, joiden sirontakulma on välillä $\alpha \dots 41^\circ$, jossa α määräytyy vyöhykkeen D leveydestä. Valon pääsy valonilmaisimelle vyöhykkeen C kuituja pitkin on estettävä.

5 Absorptiomittauksessa voidaan menetellä kahdella tavalla: näytteen läpi pääsevä valo voidaan mitata joko kyvetin yläpuolelle sijoitetulla valonilmaisimella tai samalla valonilmaisimella kuin muissakin mittaustavoissa. Jälkimmäisessä tapauksessa kyvetin yläpuolelle on asetettava valoa
10 heijastava pinta, jonka mieluiten tulisi olla himmeän valkoinen.

Laitteessa voi olla irroitettava kyvetistö ja erillinen optiikka joka kyvetiä varten. Kyvettisylinterien sivuseinät ovat läpinäkyvät tai heijastavat. Valo voidaan ke-
15 rätä ilmaisimelle myös kokonaan ilman linssejä, koska myös optisella kuidulla on oma rajakulmansa, jota suuremmassa kulmassa tulevat valonsäteet eivät etene kuidussa. Myös kyvetin pohja, jos se on sopivasti muotoiltu, voi toimia linssinä.

20 Laitteessa voi myös olla toinen, vertailuvalonilmaisim, jolle valo johdetaan valolähteestä suoraan. Tällöin laitteessa voi olla valonvaihtaja, joka vaihtaa valonlähteen valon kulkemaan vuoroin kyvettiin vievää ja vuoroin suoraan vertailuvalonilmaisimelle vievää valotietä pitkin. Valon-
25 vaihtaja voi olla kolmiasentoinen, joka ensimmäisessä asennossaan saattaa valonlähteen valon kulkemaan kyvettiin vievää ja toisessa asennossaan suoraan vertailuvalonilmaisimelle vievää valotietä pitkin sekä kolmannessa asennossaan estää valon pääsyn kumpaankin valotiehen. Vuorottelu ta-
30 pahtuu erityisesti epäsymmetrisesti ja siten, että valonlähteestä kyvettiin vievä valotie on suurimman osan ajasta auki.

Patenttivaatimukset

1. Laitteisto nestenäytteen fluoresenssin, luminesenssin, sameuden ja absorption mittaamiseksi lieriömaisessä, läpinäkyvällä pohjalla varustetussa kyvetissä (1), jonka
5 seinämämateriaalin (2) taitekerroin on suurempi kuin sekä mitattavan nesteen että ympäröivän väliaineen ja johon valo on sovitettu johdettavaksi valonlähteestä optisten kuitujen (A) avulla kyvetin keskiakselia pitkin, johon laitteistoon kuuluu optinen systeemi (5;6), jonka optinen akseli yhtyy
10 mitattavan kyvetin keskiakseliin, sekä valonilmaisimella, t u n n e t t u siitä, että optinen systeemi (5;6) on sovitettu keräämään valonilmaisimelle olennaisesti yhtä suuri osuus jokaisesta näytteen tilavuusalkiosta lähtevästä valosta kyvetin ulkoseinämistä tapahtuvan kokonaisheijastuksen avulla
15 ja että kyseinen optinen systeemi on sovitettu kollimoimaan myös kyvettiin johdettavan valonlähteen valo.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laitteisto, t u n n e t t u siitä, että optinen systeemi (5;6) sijaitsee kyvetin alapuolella tai osa siitä on sovitettu itse kyvetin
20 pohjaksi ja että optiseen systeemiin on kiinnitetty valonlähteestä tulevan kuitukimpun (A) pää sekä optisesta systeemistä valonilmaisimeen johtavan kuitukimpun (C;D) pää.

3. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen laitteisto, t u n n e t t u siitä, että valonilmaisimelle johtava
25 kuitukimppu (C;D) on sovitettu valonlähteestä tulevan kuitukimpun (A) ympärille samankeskisesti siten, että optisen systeemin puoleisessa kuitukimppujen yhteisessä päätetasossa ne sijaitsevat välin päässä toisistaan siten, että niiden väliin jää rengasvyöhyke.

4. Patenttivaatimusten 2 tai 3 mukainen laitteisto, t u n n e t t u siitä, että kuitukimppujen pään ja kyvetin
30 pohjan välissä optisena systeiminä (5;6) on kaksi tasokupe-
raa linssiä, joista ensimmäisen (6) tasopinta on kiinni kuitukimppujen yhteisessä päätetasossa (4) ja toisen (5)
35 tasopinta on käännetty kyvettiin päin, ensimmäisen linssin kuperan pinnan kaarevuuskeskipisteen ollessa sen kuitukimpun (A) päässä, jota myöten valonlähteestä mahdollisesti tuleva valo kulkee.

5. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen laitteisto, t u n n e t t u siitä, että kyvetin valonlähteeseen nähden vastakkaisella puolella on toinen valonilmaisinsin, jota käytetään näytteen absorption mittaukseen.

5 6. Menetelmä nestenäytteen fluoresenssin, luminesenssin, sameuden ja absorption mittaamiseksi lieriömäisessä, läpinäkyvällä pohjalla varustetussa kyvetissä (1), jonka seinämämateriaalin (2) taitekerroin on suurempi kuin sekä mitattavan nesteen että ympäröivän väliaineen, jossa mene-
10 telmässä valo johdetaan kyvetiin optisten kuitujen avulla kyvetin keskiakselia pitkin, laitteistossa, johon kuuluu optinen systeemi (5;6), jonka optinen akseli yhtyy mitattavan kyvetin keskiakseliin, sekä valonilmaisinsin, t u n n e t t u siitä, että olennaisesti yhtä suuri osuus jokaisesta näyt-
15 teen tilavuusalkiosta lähtevästä valosta kerätään ilmaistavaksi kyvetin ulkoseinämistä tapahtuvan kokonaisheijastuksen avulla optisen systeemin (5;6) kautta valonilmaisimelle ja että kyseisen optisen systeemin avulla kollimoidaan myös kyvetiin johdettavan valonlähteen valo.

Patentkrav

1. Anläggning för mätning av ett vätskeprovs fluo-
rescens, luminiscens, grumlighet och adsorption i en cy-
lindrisk med genomskinligt botten försedd kuvett (1),
vars väggmaterials (2) brytningskoefficient är större
5 än såväl vätskans som skall mätas som det omgivande me-
diets och vartill ljuset anordnats att ledas från ljus-
källan med tillhjälp av optiska fibrer (a) utmed kuvet-
tens mittaxel, till vilken anläggning hör ett optiskt
system (5;6), vars optiska axel sammanfaller med mitt-
10 axeln för den kuvett som skall mätas, samt en ljusindi-
kator, k ä n n e t e c k n a d därav, att det optiska
systemet (5;6) anordnats att insamla till ljusindika-
torn en väsentligen lika stor andel av det från varje
volymelement av provet utgående ljuset med tillhjälp
15 av den från kuvettens ytterväggar skeende totalreflek-
tionen och att ifrågavarande optiska system även anord-
nats att insamla det ljus, som från ljuskällan skall le-
das till kuvetten.

2. Anläggning enligt patentkrav 1, k ä n n e -
20 t e c k n a d därav, att det optiska systemet (5;6) är
beläget på undre sidan om kuvetten eller en del därav
anordnats som botten för själva kuvetten och att till
det optiska systemet anslutits ändan av det från ljus-
källan kommande fiberknippet (A) samt ändan av det från
25 det optiska systemet till ljusindikatorn ledande fiber-
knippet (C;D).

3. Anläggning enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n -
n e t e c k n a d därav, att det till ljusindikatorn
ledande fiberknippet (C;D) anordnats omkring det från
30 ljuskällan kommande fiberknippet (A) koncentriskt så,
att fiberknippena i sitt gemensamma gavelplan närmast
det optiska systemet befinner sig på ett avstånd från
varandra så att mellan dem lämnats en ringzon.

4. Anläggning enligt patentkrav 2 eller 3, k ä n -
n e t e c k n a d därav, att det optiska systemet(5;6)
mellan fiberknippets ända och kuvettens botten består av
två plankonvexa linser, av vilka den förstas(6) planyta
5 sitter fast vid fiberknippenas gemensamma gavelplan (4)
och den andras (5) planyta är vänd mot kuvetten, varvid
bågmedelpunkten för den första linsens konvexa yta be-
finner sig på ändan av det fiberknippe (A), utmed vilket
från ljuskällan eventuellt kommande ljus fortplantas.

10 5. Anläggning enligt något av föregående patent-
krav, k ä n n e t e c k n a d därav, att på den i för-
hållande till ljuskällan motsatta sidan om kuvetten är
en andra ljusindikator, som användes för mätning av
provets adsorbtion.

15 6. Förfarande för mätning av ett vätskeprovs fluo-
rescens, luminiscens, grumlighet och adsorbtion i en
cylindrisk med genomskinligt botten försedd kuvett (1),
vars väggmaterials (2) brytningskoefficient är större
än såväl vätskans som skall mätas som det omgivande me-
20 diets, i vilket förfarande ljuset ledes till kuvetten
med tillhjälp av optiska fibrer utmed kuvettens mitt-
axel, i en anläggning, vartill hör ett optiskt system
(5;6), vars optiska axel sammanfaller med mittaxeln för
den kuvett som skall mätas, samt en ljusindikator,
25 k ä n n e t e c k n a t därav, att väsentligen lika
stor andel av det från varje volymelement av provet ut-
gående ljuset insamlas för indikation medelst den tota-
la reflektionen från kuvettens ytterväggar via det optis-
ka systemet (5;6) till en ljusindikator och att med ifrå-
30 gavarande optiska system insamlas även det ljus, som
från ljuskällan skall ledas till kuvetten.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan liittotasavalta-
Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 3 122 896 (G 01 N 21/03), 1 959 612
(G 01 j 1/42), 2 630 606 (G 01 N 21/52). Iso-Britannia-Storbritanni-
en(GB) 2 041 516 (G 01 N 21/53).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 508 830 (G 01 N 21/00),
3 306 157 (356-208).

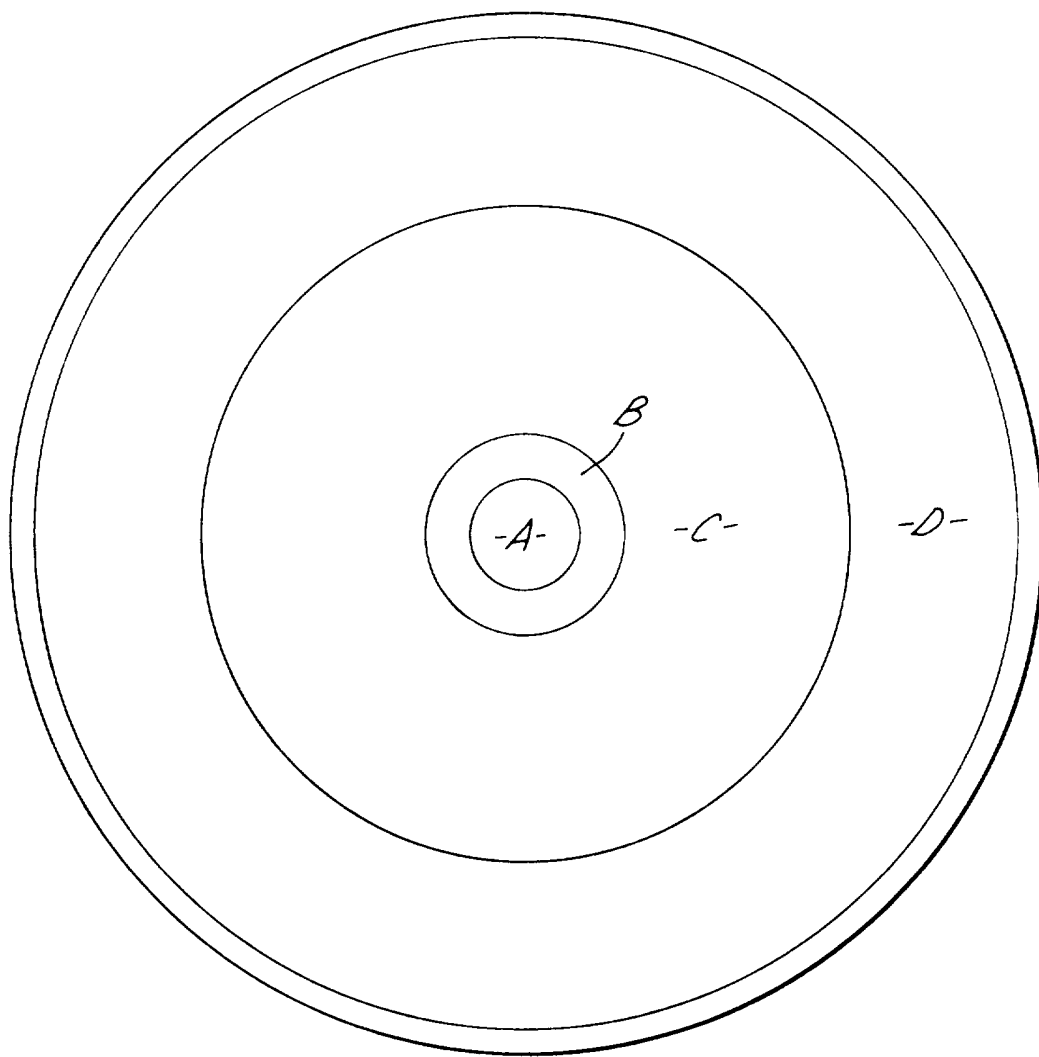
Fig .1.

Fig .2.