



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 235 916 A1

4(51) G 01 N 1/28

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 274 525 7

(22) 28.03.85

(44) 21.05.86

(71) Forschungsinstitut für Medizin, Diagnostik, 8080 Dresden; Karl-Marx-Straße 3, DD

(72) Jänchen, Michael, Dr. rer. nat.; Grünig, Gabriele, Dr. rer. nat.; Kühnel, Siegfried, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Vorbereitung von Untersuchungsflüssigkeiten für Fließsysteme

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein einfaches Verfahren zur Vorverdünnung von flüssigen Untersuchungsmaterialien für die Bestimmung von darin enthaltenen Untersuchungsparametern mittels verschiedener Methoden im Fließsystem, bei denen eine Änderung des Meßsignals per Zeiteinheit gemessen werden soll. Das Untersuchungsmaterial wird in bestimmtem Verhältnis zur Pufferlösung zusammen mit letzterer in ein Mischstück überführt und weiter in die Meßzelle (optisch, elektrochemisch) transportiert, wobei jeweils eine Luftblase Anfang und Ende des verdünnten Probestückes markiert. Das Verfahren ist in chemischen und biochemischen Labors bei der Probenanalyse im Fließsystem anzuwenden. Fig. 1

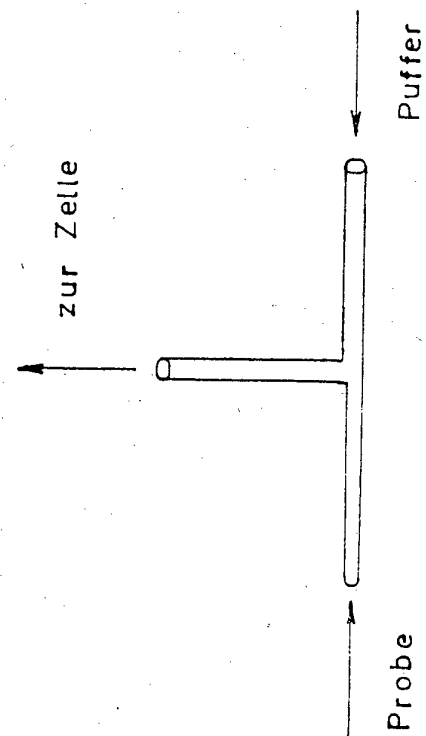


Fig. 1

Erfindungsanspruch:

1. Ein Verfahren zur Vorbereitung von Flüssigkeiten für Untersuchungen zur Bestimmung von klinisch chemischen oder biochemischen Parametern mittels elektrochemischer oder optischer Methoden im Fließsystem, **gekennzeichnet dadurch**, daß mit Hilfe eines Mischstücks die unverdünnte Probelösung mit Puffer gemischt wird, wobei nur zwei Luftblasen sowohl Anfang als auch Ende der unverdünnten Lösung markieren und vor der Mischung diese vom Puffer trennen, als auch nach der Verdünnung im Mischstück wieder zur Abtrennung der vorverdünnten Probe dienen.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß mit Hilfe des Mischstücks Urin- und Serumproben, Fermentationslösungen oder industrielle Abwässer zur Bestimmung von klinisch chemischen oder biochemischen Parametern vorverdünnt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß durch die Art der Probenaufnahme am Probenspeicher die Luftblasen an Anfang und Ende der unverdünnten Probelösung gebracht werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die unverdünnte Probelösung aus einer Dosierschleife mit je einer Luftblase an Anfang und Ende zum Mischstück transportiert und dort verdünnt werden.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Verdünnung von Lösungen oder biologischen Flüssigkeiten mittels eines Mischstücks für die Bestimmung von darin enthaltenen Parametern im Fließsystem für routinemäßige Untersuchungen, vorwiegend an automatisierten Meßplätzen mit kinetischer oder stationärer Meßwertanzeige.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Anwendung verschiedener Meßmethoden zur automatisierten Bestimmung von Parametern in Flüssigkeiten nach dem Fließprinzip erfolgt in Durchflußzellen mit entsprechenden Sensoren bzw. Küvetten. Um Fehler und Störungen im Fließsystem, insbesondere für die kinetische Meßwertaufnahme, durch Verzerrung des wahren Probekonzentrationsprofils zu vermeiden, ist vor allem eine Probenverdünnung vorzunehmen. Das ist einerseits mit einer manuellen externen Verdünnung möglich (Bertermann, K., Pfeiffer, D., Diss., AdW der DDR, Berlin 1983), oder andererseits an eine längere Mischstrecke mit Luftblaseneinführung, Mischstück und Entlüftungsteil, den sogenannten luftsegmentierten Flüssigkeitsstrom (Kontinuierlicher Analysenautomat, Gebrauchsanleitung, VEB MLW, S. 4, 1976; „SMA 12/60“, Firmenschrift Technicon Corp., Bad Vilbel, 1976) gebunden. Die Verwendung von Mischstücken mit Luftblaseneinführung und -abscheidung ist durch Dispersionseffekte für diese Art Messungen problematisch, was in einer Verringerung der Empfindlichkeit zum Ausdruck kommt. Hier wird der Weg bzw. die Zeit von der Probenahme zur Meßzelle wesentlich größer. Die von flow injection-Apparaturen her bekannten Confluenzeinheiten sind für kinetische Messungen ebenfalls nur bedingt anzuwenden, weil sich das in einer erhöhten Dispersion äußert.

Ein Übergang zwischen flow injection und normaler Durchflußapparatur stellt eine an sich bekannte Anordnung mit Luftblasentrennung zwischen Spülflüssigkeit und Probelösung dar, wobei Anfang und Ende des Probelösungssegments durch nur jeweils eine Luftblase von der Spülflüssigkeit getrennt sind.

Mit dieser Methode wurden erfolgreich kinetisch elektrochemische und enzymelektrochemische Substratbestimmungen durchgeführt (M. Jänchen, G. Walzel, K. Bertermann, F. Scheller, Tagungsbd. „Electrochemical Detection in Flow Analysis“, Akademiai Kiado, Budapest, S. 227, 1983). Der Einsatz extern verdünnter Proben zur Meßbereichsanpassung ist jedoch erforderlich. Dadurch wird der Vorteil eines vorbehandlungsfreien Probeneinsatzes vergeben und es wird ein Diluter bzw. Dosierer und zusätzlich die entsprechende Anzahl von Probengefäßen nötig.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, den externen Verdünnungsschritt bzw. die zusätzliche Vorbereitungsstrecke durch eine Mischung des biologischen Probenmaterials mit dem Puffer vor der Durchflußzelle zu ersetzen. Dadurch werden Geräte, z. B. Diluter bzw. Dosierer, sowie zusätzliche Vajacgefäße bzw. die Vorbereitungsstrecke mit Luftblaseneinführung und Entlüftungsteil eingespart. Der Zeitaufwand zur Probenvorbereitung bzw. Transport der Probe durch die Vorbereitungsstrecke wird verringert. Die Probenmenge beträgt nur ca. $\frac{1}{3}$ der ehemals erforderlichen Menge.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das Wesen der Erfindung besteht darin, mit Hilfe eines Mischstücks das biologische Material, wie Serum, Urin mit dem Puffer zu mischen, wobei zwei Luftblasen an Anfang und Ende die noch nicht verdünnte Probe vom Puffer trennen, nach der Verdünnung im Mischstück wieder zur Abtrennung der vorverdünnten, zur Messung vorbereiteten Probe dienen. Nach dieser Vorverdünnung wird die Probe sofort zur Durchflußzelle geleitet. Das Mischungsverhältnis der Probe mit dem Puffer wird durch die Schlauchdurchmesser in der Dosierpumpe bestimmt. Das an sich bekannte Mischstück hat eine T-Form, wobei das Untersuchungsmaterial mit dem Puffer im Winkel von 180° zusammenfließt und senkrecht dazu abfließt. Der Schlauch vom Mischstück zur Meßzelle hat eine optimierte Länge, die durch den nötigen Weg zur Durchmischung und möglichst geringe Länge für eine hohe Empfindlichkeit bestimmt wird.

Bei der Messung bestimmter Substrate, z. B. Harnsäure, muß die Durchflußgeschwindigkeit mindestens 2 ml/min betragen, weil im anderen Fall bei der Eichung mit wäßrigen Harnsäurelösungen (Arzneimittelbuch der DDR AB (D. L.) DDR 83, Akademie Verlag Berlin, 1983) ein Fehler auftritt, der nur durch Zugabe einer dem Normalbereich entsprechenden Albuminmenge zu vermeiden ist.

Durch Messung von wäßrigen Harnsäurevergleichslösungen mit unterschiedlichem Albumingehalt konnte eine direkte Abhängigkeit des Meßsignals vom Albumingehalt beobachtet werden. Durch Albuminzugabe wird ein Teil der Harnsäure an das Eiweiß gebunden und kann nicht gemessen werden. Damit liegen dann gleiche Verhältnisse im Vergleich zum Blutserum vor. Bei erhöhter Fließgeschwindigkeit, $v \geq 2$ ml/min, tritt dieses Problem nicht auf, weil sich der Harnsäure-Eiweiß-Komplex in der kurzen Zeit nicht bilden kann.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachfolgend an drei Ausführungsbeispielen erläutert werden. In der beigefügten Zeichnung zeigt Fig. 1 ein Beispiel für ein Mischstück.

Beispiel 1

Meßanordnung

Verwendet wird eine amperometrische Meßeinrichtung mit kinetischer oder stationärer Auswerteeinheit, Probenspeicher, Dosierpumpe und Durchflußmeßzelle, die mit einer Enzymelektrode über eine H_2O_2 -Anzeige, die dem Clark-Typ mit einer für niedermolekulare Stoffe durchlässigen Membran entspricht, zur Harnsäurekonzentrationsbestimmung ausgerüstet ist. Dabei dient die maximale Oxydationsänderungsgeschwindigkeit des H_2O_2 als Meßsignal.

Meßvorgang

Im Probenspeicher befinden sich Patientenserum, die durch das Schlauchsystem mittels der Dosierpumpe angesaugt und mit dem Phosphatpuffer im Verhältnis 1:20 in das Mischstück sowie weiter zur Durchflußzelle transportiert werden. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 2 ml/min, die Probenrate 60-80 Stck/h. Die Zeit von der Probennahme bis zum Erscheinen des Meßsignals beträgt etwa 1-2 Minuten, wobei der Meßwert 10 Sekunden nach Kontakt der Probenlösung mit dem Enzymsensor erscheint. Die Meßkurven werden kontinuierlich aufgezeichnet. Die Maxima bilden die gesuchten Meßpunkte.

Beispiel 2

Meßanordnung

Verwendet werden die Geräte aus Beispiel 1 mit dem Unterschied, daß anstelle der Elektrodenzelle eine Photometerdurchflußküvette mit Photometer dient, wobei ebenfalls eine kinetische Bestimmung durchgeführt wird (Δ Extinktion/ Δ t). Die zu bestimmende Substanz aus einer biologischen Untersuchungsflüssigkeit ist dabei z. B. NADH. Das Störsignal durch die Küvette tretender einzelner Luftblasen läßt sich dabei leicht elektronisch oder in anderer Weise auswertetechnisch eliminieren.

Meßvorgang

wie Beispiel 1

Beispiel 3

Meßanordnung

wie Beispiel 1 oder 2

Meßvorgang

Im Probenspeicher befinden sich unverdünnte Urinproben, die mit Hilfe des beschriebenen Systems mit Phosphatpuffer gemischt und zur Glucosebestimmung in die mit einer Glucoseoxydaseenzymelektrode versehene Durchflußzelle gebracht werden. Dabei dient wiederum wie im Beispiel 1 die Änderung des H_2O_2 -Signals pro Zeiteinheit als Meßsignal. Das Mischstück ist dabei so bemessen, daß eine ca. 1:100fache Verdünnung der Probe bei sehr hohen Glucosekonzentrationen resultiert, wobei in einigen Fällen die Messungen mit 1:1 oder höher verdünnten Urinen zu wiederholen ist.

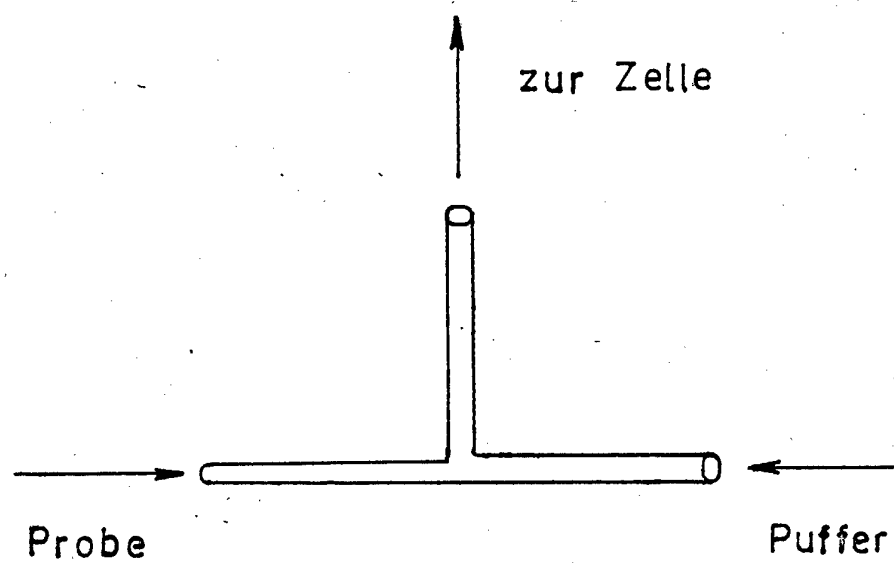


Fig. 1