



**Анализатор электронного парамагнитного резонанса лабораторный
типа „ESR-Analysator / MMS 01 – 08“**

Инструкция по эксплуатации

**MedInnovation GmbH
Berlin**

Содержание

1. Общие сведения о лабораторном ЭПР-анализаторе	4
1.1. Применимость инструкции по эксплуатации	4
1.2. Назначение Анализатора	4
1.3. Соответствие нормам ЕС	4
1.4. Внешний вид	5
1.5. Транспортировка	5
1.6. Комплектность	6
1.7. Правила безопасности	7
1.8. Условия эксплуатации	8
1.9. Установка	8
1.9.1. Первое включение Анализатора	9
1.9.2. Подготовка Анализатора к работе	9
2. Технические характеристики	10
2.1. Основные функциональные характеристики Анализатора	10
2.2. Параметры	11
2.3. Дополнительные характеристики	12
2.4. Совместимость программного обеспечения	12
3. Использование Анализатора для научных исследований	13
3.1. Измерение спектров ЭПР	13
3.2. Использование Анализатора для физико-химических исследований	16
3.2.1. Пример. Анализ смеси свободных радикалов. Измерение концентрации.	16
3.2.2. Пример. Анализ состояния свободного радикала	18
3.2.3. Пример. Анализ кинетики свободных радикалов.	18
3.3. Использование Анализатора для биомедицинских исследований	20
3.3.1. Пример. Анализ связывания спиновой пробы протеином.	20
4. Специальные функции Анализатора	24
4.1. MMS-исследование альбуминосодержащих образцов	24
4.1.1. Принцип MMS-исследования	24
4.1.2. Условия проведения исследования	24
4.1.3. Исследуемые образцы	24
4.1.4. Проверка чистоты резонатора и ампулы	25
4.1.5. Проведение MMS-исследования	25
4.1.6. Окно результатов MMS-исследования	26
4.1.7. Создание таблицы из набора файлов результатов MMS-исследования	26
4.1.8. Описание текстовых файлов результатов MMS-исследования	27
4.2. Оценка концентрации растворов спинового зонда	29
4.2.1. Принцип оценки	29
4.2.2. Оцениваемые растворы	29
4.2.3. Условия проведения	29
4.2.4. Проверка чистоты тест-системы и резонатора	29
4.2.5. Наполнение капилляра раствором спинового зонда	29
4.2.6. Автоматическая оценка концентрации спинового зонда	30
5. Техническое обслуживание	32
6. Сервисное обслуживание	32
7. Утилизация	32
8. Действия в случае возникновения неполадок	33
ПРИЛОЖЕНИЕ Калибровка Анализатора	34

1. Общие сведения о лабораторном ЭПР-анализаторе

1.1. Применимость инструкции по эксплуатации

Данная инструкция предназначена для анализатора электронного парамагнитного резонанса лабораторного типа „ESR Analysator / MMS 01 – 08“, далее по тексту – Анализатор, с серийным номером: 01 – 08 – хх.

1.2. Назначение Анализатора

Анализатор, применяется в медицинских лабораторных исследованиях (in vitro) для физико-химического анализа методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) функциональных характеристик белков и других микрообъектов в пробах крови и других биологических жидкостях.

1.3. Соответствие нормам ЕС

Анализатор производится фирмой MedInnovation GmbH (Nonnendamallee 42–43, 13599 Berlin, Germany), имеющей систему менеджмента качества производителя медицинского оборудования, сертифицированную согласно нормам DIN EN ISO 13485 (Сертификат EN ISO 13485:2003 с регистрационным номером SX 60011052 0001).

Адрес: Nonnendamallee 42–43, 13599 Berlin, Germany.

Сервис-центр: ESR-Analyselabor, Freiheitstrasse 124/126, 15745 Wildau, Germany

Анализатор имеет знак „IVD CE marking“ соответствия нормам директивы ЕС 98/79 IVD (in vitro диагностика), наряду с действующими стандартами ЕС.

Безопасность Анализатора соответствует следующим нормам ЕС:

- Директива по низковольтному оборудованию 72/23/EWG от 19.02.1973, включая изменения 93/68/EWG от 05.03.1989;
- EN 61010-1 – требования безопасности к электрическому оборудованию для измерений, контроля и лабораторного применения;
- EN 61010-2-101 – частные требования к in vitro диагностическому медицинскому оборудованию.

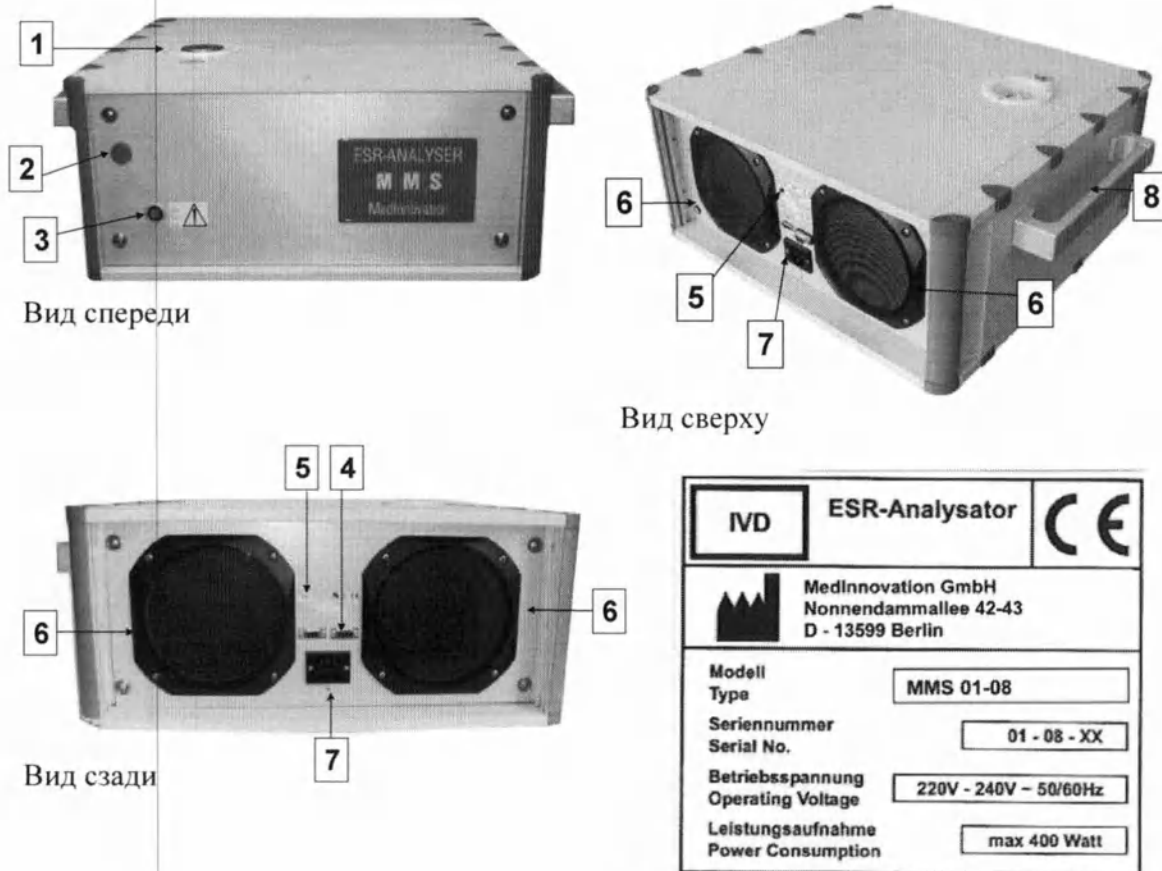
По электромагнитной совместимости устройство соответствует следующим гармонизированным нормам ЕС:

- Директива по электромагнитной совместимости 89/336/EWG от 03.05.1989, включая изменения 92/31/EWG, и закону Германии EMVG:1998;
- EN 61326-1 – требования электромагнитной совместимости к оборудованию электрическому лабораторному для измерения и управления;
- EN 61000-3-2 – нормы выбросов для синусоидального тока;
- EN 61000-3-3 – ограничение перепадов напряжения, колебаний напряжения и мерцания в низковольтных коммунальных системах электроснабжения.
- EN 61326 класс B, EN 55022 класс B – эмиссия помех;
- IEC 61000-4-2 – помехоустойчивость к электростатическому разряду;
- IEC 61000-4-3 – помехоустойчивость к воздействию электромагнитного поля радиочастотного диапазона;
- IEC 61000-4-4 – помехоустойчивость к быстрым электрическим переходным процессам или всплескам;
- IEC 61000-4-5 – помехоустойчивость к импульсам высокой частоты;

- IEC 61000-4-6 – помехоустойчивость к воздействию кондуктивных помех, наведенных радиочастотными полями;
- EN 61000-4-11 – помехоустойчивость к падению напряжения, коротким перерывам в подаче энергии и изменениям напряжения.

Данные нормы эмиссии помех и помехоустойчивости применяются к оборудованию, длительно используемому без наблюдения.

1.4. Внешний вид



Этикетка с идентификационными данными Анализатора и знаком "IVD CE marking"

Рис. 1. Внешний вид Анализатора.

1 – отверстие для размещения образца, закрытое крышкой; 2 – CE-символ; 3 – выключатель питания; 4 – разъемы интерфейса RS232 (для соединения с ПК); 5 – этикетка с идентификационными данными Анализатора; 6 – вентиляционные решетки; 7 – разъем для подключения кабеля питания или сетевого кабеля 220/230 В, 50 Гц; 8 – ручки для транспортировки.

1.5. Транспортировка

Анализатор и его принадлежности следует транспортировать бережно, избегая ударов и вибрации.

Анализатор не должен размещаться близко возле устройств, создающих интенсивные электромагнитные поля, поскольку таковые могут оказывать существенное влияние на результаты измерений.

Анализатор не производит опасных внешних электромагнитных излучений.

Размеры Анализатора:

- ширина 667 мм, длина 541 мм, высота 260 мм;
- без ручек и опор: ширина 562 мм, длина 541 мм, высота 250 мм;
- вес приблизительно 60 кг.

1.6. Комплектность

Комплект поставки Анализатора включает:

Наименование и условное обозначение	Количество, шт.
Анализатор „ESR Analysator / MMS 01 – 08“	1
¹ Источник бесперебойного питания Xanto XS700	1
Кабель питания	1
Интерфейсный кабель RS232	1
USB-RS232 конвертер	1
Крышка отверстия для размещения образца	1
Компакт-диск с программным обеспечением MMSCClient	1
Электронный термометр (модель „Checktemp-1“, HANNA Instruments, или аналогичный)	1
Набор принадлежностей	1
Комплект эксплуатационной документации	1
Упаковка	1

Состав набора принадлежностей:

Наименование и условное обозначение	Количество, шт.
Ампула с отделяющимся держателем	1
Ампула с фиксированным держателем	1
Стержень для чистки ампулы	1
Наконечник для микропипетки с резиновой трубкой	1
Тест-система типа TS1-xx для проверки концентрации растворов спиновое зонда, с паспортом	1
Калибровочный образец типа RS1-xx (Mn^{2+} в матрице MgO), в ампуле, с паспортом	1
Калибровочный образец типа RS2-xx (Mn^{2+} в матрице MgO), в капилляре, с паспортом	1
Калибровочный образец типа RS3-xx (ДФПГ, свободные радикалы), в капилляре, с паспортом	1
Футляр	1

¹ Поставляется только по запросу, в случае если сеть электропитания лаборатории пользователя обеспечивает недостаточную стабильность или имеет повышенные требования по электромагнитной совместимости

Состав эксплуатационной документации:

- Инструкция по эксплуатации
- Руководство по использованию программного MMSCClient.

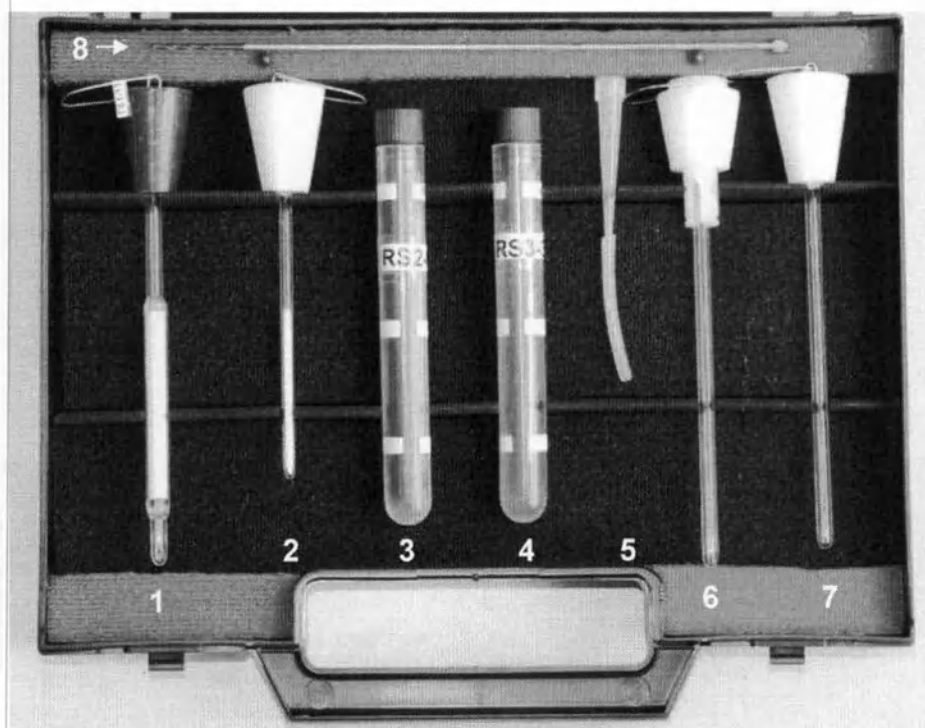


Рис. 2. Набор принадлежностей (в футляре).

1 – тест-система типа TS1-xx для проверки концентрации спинного зонда; 2 – калибровочный образец типа RS1-xx – Mn^{2+}/MgO в ампуле; 3 – пробирка, содержащая калибровочный образец типа RS2-xx – Mn^{2+}/MgO в капилляре; 4 – пробирка, содержащая калибровочный образец типа RS3-xx – DPPH (свободные радикалы); 5 – наконечник для микропипетки с резиновой трубкой; 6 – ампула с отделяющимся держателем; 7 – ампула с фиксированным держателем; 8 – стержень для очистки ампулы.



Пожалуйста, проверьте полученное оборудование на комплектность и на возможные повреждения при транспортировке!

В случае отсутствия каких-то элементов комплекта или их повреждения, пожалуйста, проинформируйте производителя до начала использования оборудования!

1.7. Правила безопасности

Устройство можно включать только в сеть переменного тока частотой 50/60 Гц и напряжением 220/230 В.

Устройство нельзя включать, если:

- поврежден кабель питания,
- Анализатор имеет видимые повреждения.

Во избежание поражения электрическим током не следует прикасаться к элементам, размещенным внутри корпуса Анализатора. Только специалисты, уполномоченные для технического обслуживания Анализатора, могут открывать корпус Анализатора.

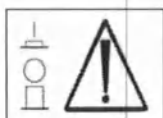
Несанкционированное вскрытие корпуса Анализатора может повлечь прекращение действия гарантийных обязательств.

В случае повреждений или неполадок Анализатора обратитесь в сервисный центр Medinnovation GmbH и сообщите данные о проблеме и серийный номер Анализатора (указан на задней панели).

MedInnovation GmbH, ESR-Analyselabor
Freiheitstrasse 124/126
D-15745 Wildau

Телефон: +49-3375-213000
Факс: +49-3375-213033
Email: info@medinnovation.de

Пожалуйста, обратите внимание на наличие следующих маркировок:



Индикация выключателя (Вкл./Выкл.), рекомендуется следовать положениям инструкции по эксплуатации



Будьте осторожны при обращении с опасными биологическими материалами – возможен риск загрязнения!

1.8. Условия эксплуатации

Устройство предназначено для использования в закрытых лабораторных помещениях при следующих условиях окружающей среды:

- температура в помещении: $(15 - 35) ^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление: $(101,3 \pm 15,4) \text{ кПа}$ ($760 \pm 116 \text{ мм рт.ст.}$);
- относительная влажность: $(20 - 75) \%$.

Анализатор должен использоваться в среде с низким уровнем электрических и электромагнитных полей.

Срок службы устройства составляет не менее 8 лет.

1.9. Установка

Для размещения устройства выберите подходящую горизонтальную, стабильную, не нагревающуюся сухую поверхность. Обратите внимание на должную циркуляцию воздуха в области задней панели Анализатора.

Если устройство подвергалось воздействию больших перепадов температур, перед его включением следует выждать приблизительно 5 часов для испарения влаги, конденсирующейся внутри Анализатора.

Используйте только источник питания и кабель, соответствующие указанным характеристикам сети питания на маркирующей этикетке Анализатора.

1.9.1. Первое включение Анализатора

- Соедините Анализатор с источником бесперебойного питания с помощью кабеля питания. Вставьте кабель питания сначала в бесперебойный источник и затем в розетку.
- Подключите интерфейсный кабель RS232 в гнездо интерфейса RS232 на задней панели Анализатора и затем в свободный COM-порт (RS232) ПК, или в порт USB с помощью конвертера USB-RS232 (в последнем случае требуется установка драйвера конвертера USB-RS232 на ПК).
- Включите ПК.
- Установите программное обеспечение MMSCClient на ПК (см. Руководство по использованию программного MMSCClient).
- Включите источник бесперебойного питания.
- Включите Анализатор.
- Запустите программу MMSCClient.exe.

1.9.2. Подготовка Анализатора к работе

Необходимо включать Анализатор за один час до начала измерений. При первом включении Анализатора после соединения с ПК, при изменении конфигурации ПК, а также при повторном соединении Анализатора с ПК рекомендуется проверить правильность подключения.

Проверка подключения Анализатора к ПК:

- Если статус ЭПР анализатора, отображаемый на панели инструментов программы MMSCClient, индицируется как „On-line“, то Анализатор подключен правильно и готов к измерениям.
- Если статус Анализатора „Initialization“, подождите приблизительно 1 минуту. Статус изменится на „On-line“ автоматически.
- Если статус Анализатора „Off-line“ или „COM Port Error“, выполните команду „Connect“, выбрав соответствующий пункт в меню „ESR analyser“.
- Если после выполнения команды „Connect“ статус Анализатора продолжает оставаться „Off-line“ или „COM Port Error“, убедитесь, что Анализатор включен, и проверьте кабель между Анализатором и ПК. Обращайтесь к специалисту службы технической поддержки, если не удастся установить связь Анализатора с ПК.

2. Технические характеристики

2.1. Основные функциональные характеристики Анализатора

- Анализатор представляет собой настольную модель высокочувствительного ($2 \cdot 10^{14}$ спин/Тл) автоматизированного анализатора спектров ЭПР, специально разработанного для применения в медицинских лабораторных исследованиях (in vitro) проб биологических жидкостей в стеклянных пробирках с внешним диаметром до 11 мм (водных растворов – с внутренним диаметром до 1 мм).
- Анализатор имеет встроенную систему термостатирования проб в диапазоне температур от 25°С до 45°С с погрешностью 0,5°С; компьютерное управление трактом СВЧ, магнитным полем и системой термостатирования; автоматическую настройку измерительной системы с двумя режимами регистрации ЭПР-спектров: адаптивный – с подстройкой частоты генератора СВЧ в зоне шириной 200 МГц для каждой исследуемой пробы; фиксированный – с подстройкой частоты резонанса измерительной ячейки при фиксированной частоте генератора СВЧ для измерения серии исследуемых проб, что обеспечивает высокую точность сравнительных измерений с применением реперной пробы и высокую точность измерения температурных и концентрационных зависимостей, кинетики реакций и т.п.
- Магнитная система представляет собой броневого электромагнит с межполюсным воздушным зазором 14,2 мм, максимальной магнитной индукцией 700 мТл, однородностью магнитного поля 2×10^{-5} в области 3 мм диаметром и 20 мм длиной. Долговременная стабильность магнитного поля обеспечивается системой стабилизации на основе термостатируемого датчика Холла. Цифровой однокристалльный микроконтроллер обеспечивает управление величиной магнитного поля в диапазоне от 10 мкТл до 700 мТл и задание параметров развертки магнитного поля с точностью 90 мкТл.
- СВЧ-тракт с генератором на диоде Ганна, мощностью 200 мВт (100 мВт в резонаторе), имеет рабочую частоту $9,45 \text{ ГГц} \pm 0,4 \text{ ГГц}$, регулируемый уровень ослабления мощности до 40 дБ. Система автоматической настройки СВЧ-тракта содержит четыре шаговых микродвигателя управляемых микроконтроллером.
- Измерительный прямоугольный резонатор имеет золотое покрытие, сквозное отверстие для размещения исследуемой пробы диаметром до 11 мм. С установленным блоком термостатирования установка проб возможна только с верхней стороны, используя кварцевые, стеклянные или пластиковые ампулы длиной от 85 мм.
- Система измерения сигнала ЭПР обеспечивает варьирование амплитуды модуляции магнитного поля от 1 мкТл до 1 мТл, 14-битовое аналого-цифровое преобразование сигнала с 4096 истинных точек магнитного поля в измеряемом спектре ЭПР; цифровую фильтрацию ЭПР-сигнала встроенным микропроцессором; накопление спектра путем многократных сканирований. Время сканирования варьируется от 4 с до 3000 с; максимальное время накопления спектра составляет 83 часа.
- Контроль параметров устройства и управление измерительным процессом обеспечиваются встроенными микроконтроллерами. Для задания параметров регистрации, анализа измеряемых спектров и расчета параметров исследуемых

образцов используется ПК, подключаемый к коммуникационному интерфейсу устройства.

- Базовое программное обеспечение совместимо с операционной системой Microsoft® Windows, и обеспечивает автоматизацию настройки Анализатора, регистрацию ЭПР-спектров, обработку и анализ спектров, вывод результатов.
- Базовое программное обеспечение содержит специальный модуль анализа многокомпонентных ЭПР-спектров методом компьютерного фитинга, разработанный на основе решений квантовых спиновых Гамильтонианов для парамагнитных систем с аксиальной и ромбической анизотропией.
- Базовое программное обеспечение содержит встроенный компилятор, используемый для программирования стандартных процедур ЭПР-исследований и последующего их выполнения в автоматическом режиме: измерение спектров, анализ и расчет параметров, сравнение с калибровочными пробами, расчет оцениваемых характеристик для каждой пробы и группы взаимосвязанных проб, сохранение и вывод результатов. Это позволяет автоматизировать выполнение однотипных исследований.
- Комплект поставки Анализатора включает калибровочные пробы для тестирования и автоматической калибровки прибора.

2.2. Параметры

Рабочая частота	9,45 ГГц $\pm$ 0,4 ГГц
Максимальная индукция магнитного поля	не менее 0,7 Тл
Нестабильность резонансных условий	не хуже 2×10^{-5} ч ⁻¹
Диапазон/время сканирования магнитного поля	10 мкТл – 0,7 Тл, время сканирования от 4 с до 3000 с
Мощность генератора СВЧ	не менее 200 мВт
Максимальное ослабление мощности СВЧ	не менее 40 дБ
Амплитуда модуляции магнитного поля	От 1 мкТл до 1 мТл
Чувствительность	не хуже 2×10^{14} спин/Тл (2×10^{10} спин/Гс)
Диапазон термостатирования образца	25° – 45° С
Погрешность задания температуры образца	не более 0,5° С
Электропитание	220 В – 240 В переменного тока, 50 – 60 Гц
Потребляемая мощность (максимум)	400 Вт
Размеры	667 × 541 × 260 мм ³
Вес	60 кг
Время установления рабочего режима	не более 60 минут
Время начала процесса измерений после размещения в измерительном резонаторе исследуемого образца	не более 1 мин
Продолжительность непрерывной работы	не менее восьми часов

2.3. Дополнительные характеристики

Магнитная система	Броневой электромагнит с межполюсным зазором 14,2 мм, $R = 21 \Omega$, максимальная рассеиваемая мощность 200 Вт
Измерительный резонатор	Прямоугольный типа Н ₁₀₂ , добротность не ниже 5000
Размеры чувствительной области измерительного резонатора	Ø 11 мм, длина 20 мм
Погрешность задания ослабления мощности СВЧ на резонаторе	не более 1 дБ
Диапазон автоматической подстройки частоты СВЧ	не менее 200 МГц
Коммуникационный интерфейс	RS232, USB 1.1/2.0 (с адаптером)

2.4. Совместимость программного обеспечения

Для нормального функционирования программы MMSCClient, управляющей работой Анализатора, ПК должен обладать следующими характеристиками:

- Эффективной частотой процессора не ниже 1 ГГц, оперативной памятью 128 Мб или больше, 10 Мб свободного места на жестком диске;
- Свободным COM или USB портом;
- Операционной системой Microsoft® Windows 2000 / XP.

3. Использование Анализатора для научных исследований

3.1. Измерение спектров ЭПР

Запустите программу MMSClnt на ПК, к которому подключен Анализатор. Введите имя оператора, который будет проводить измерения.

Вставьте держатель с ампулой, в которой находится образец со свободными радикалами, в резонатор. Убедитесь, что образец расположен в чувствительной области резонатора. См. Рис. 3 для проверки правильного расположения образца.

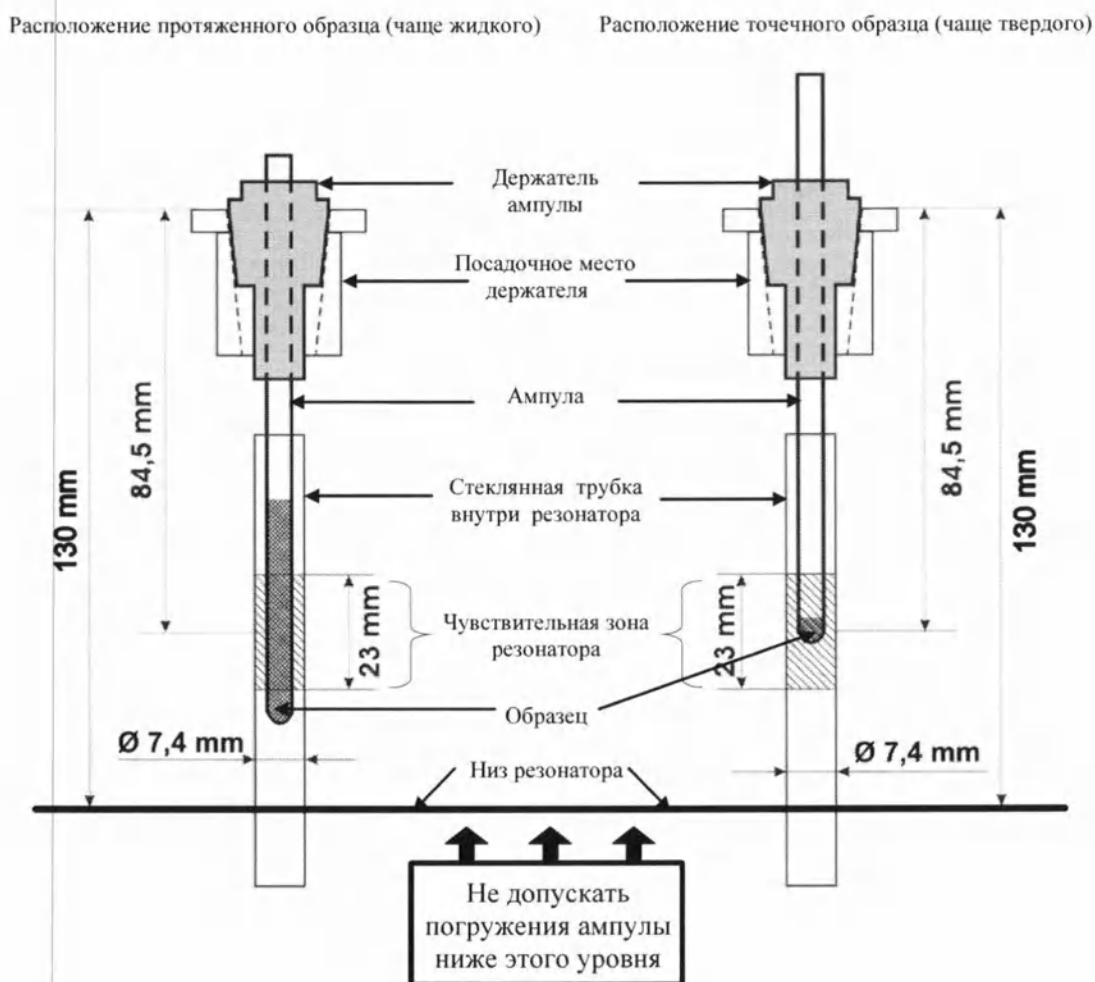


Рис. 3. Правильное размещение образцов в ампуле, помещаемой в резонатор Анализатора для измерения ЭПР-спектров.

В меню „ESR-Analyser“ выберите „Settings..“. Здесь задаются параметры прибора перед измерением спектров. Оптимальные параметры для измерения ЭПР-спектра калибровочного образца RS3-xx, содержащего ДФПГ, входящего в комплект поставки Анализатора, указаны на Рис. 4.

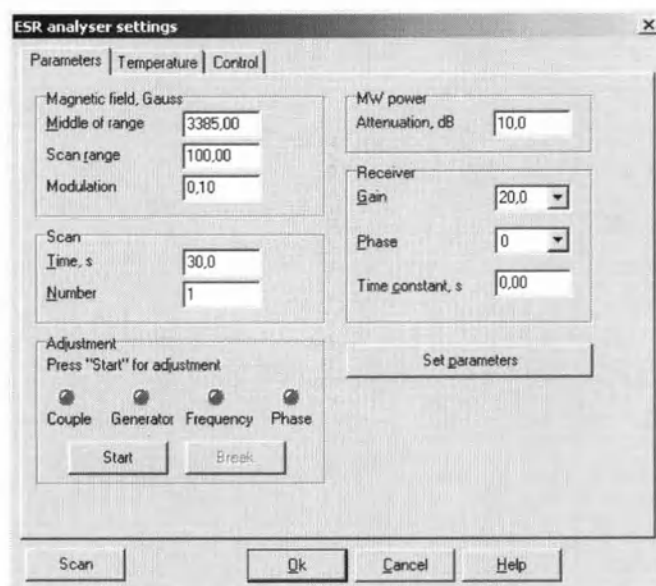


Рис. 4. Оптимальные параметры для измерения ЭПР-спектра калибровочного образца RS3-xx, содержащего ДФПГ.

В случае изменения одного или нескольких параметров в форме, показанной выше, нажмите „Set parameters“, чтобы переслать параметры в Анализатор. В Руководстве по использованию программного MMSClnt вы найдете более подробное описание всех изменяемых параметров и настроек Анализатора.

После помещения образца в резонатор необходимо настроить Анализатор. Для этого необходимо нажать „Start“ в окне „ESR analyser settings“. В случае первого измерения после включения устройства или изменения СВЧ мощности настройка начнется автоматически сразу после запуска измерения спектра.

При необходимости измерить спектр при определенной фиксированной температуре, необходимо выполнить следующее. В меню „ESR-analyser“ выберите пункт „Settings..“ и затем закладку „Temperature“ (Рис. 5). В поле „Temp. °C“ введите нужное значение температуры и нажмите „Set“. Не начинайте измерение спектра пока значение параметра „Sample“ не достигнет температуры ($\pm 0,2$ °C), введенной вами в поле „Temp. °C“. Также имеется возможность контролировать значение температуры образца в поле „ESR-Analyser Status“ в основном окне программы.

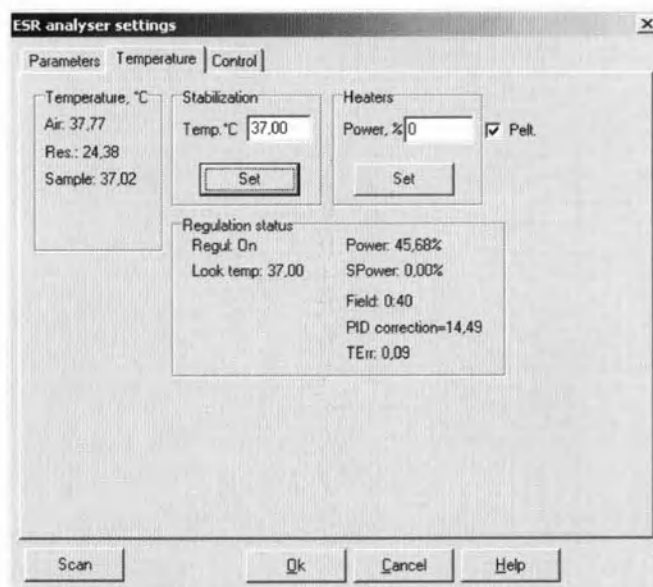


Рис. 5. Окно задания параметров термостабилизации измеряемого образца.

Нажмите кнопку „Scan“, чтобы начать измерение спектра. Если окно „ESR-analyser“ не открыто, вы можете начать измерение спектра, выбрав пункт „Scan“ в меню „ESR-analyser“.

При измерении спектра, на мониторе ПК появится следующее изображение (Рис. 6):

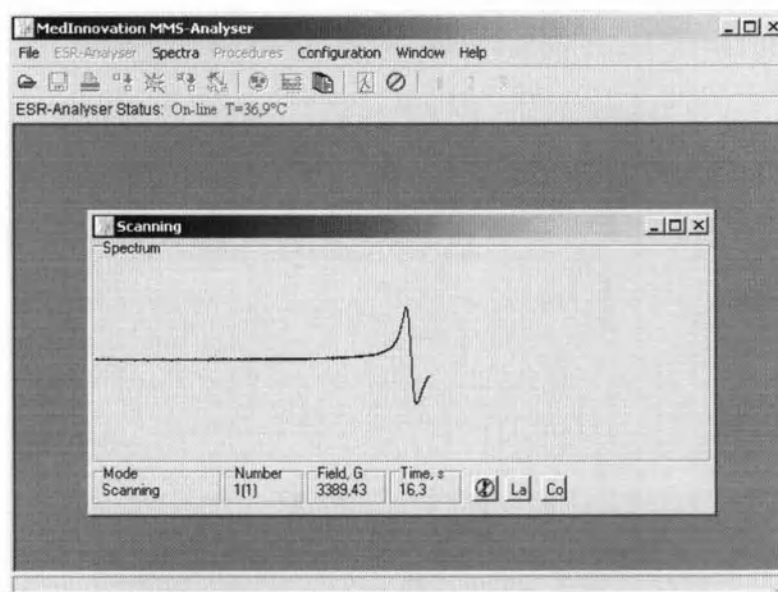


Рис. 6. Измерение ЭПР-спектра калибровочного образца RS3-xx, содержащего ДФПГ.

Измерение спектра закончится, когда черная спектральная линия достигнет правого края окна.

После измерения спектр будет помещен в отдельное окно, как показано ниже (Рис. 7):

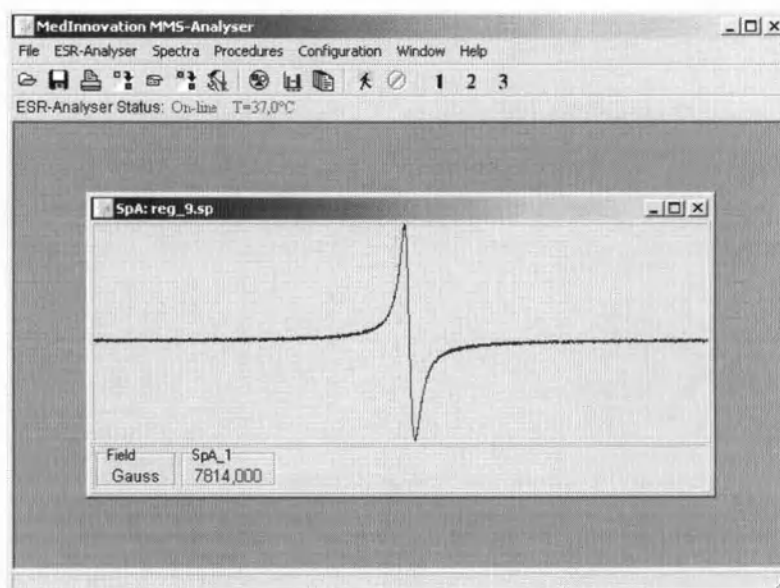


Рис. 7. Окно, содержащее измеренный ЭПР-спектр калибровочного образца RS3-xx.

Выберите пункт „Save As“ в меню „File“, чтобы сохранить спектр. Чтобы напечатать изображение спектра выберите пункт „Print“ в том же меню. Спектр можно обработать, используя функции раздела „Processing“ в меню „Spectra“. Подробное описание возможностей обработки спектра изложено в Руководстве по использованию программного MMSClient.

3.2. Использование Анализатора для физико-химических исследований

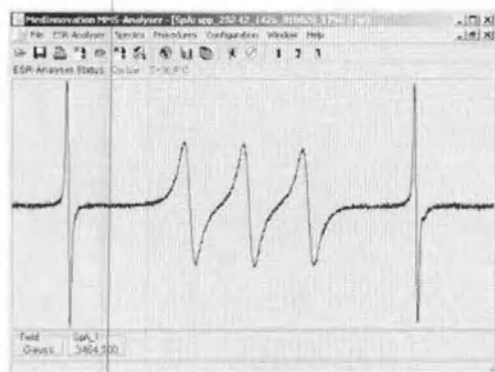
Анализатор обеспечивает измерение ЭПР-спектров кристаллов, порошков и жидких образцов, а также точный анализ спектров, заключающийся в вычислении основных спектроскопических параметров радикалов: относительной концентрации различных радикалов, главных значений тензоров g-фактора и СТС (сверхтонкой структуры), ширин спектральных линий, параметров супер-СТС, обусловленной отдаленными лигандами.

Два основных этапа анализа образца – это измерение ЭПР-спектров и вычисление характеристик молекул радикалов путем симулирования спектров.

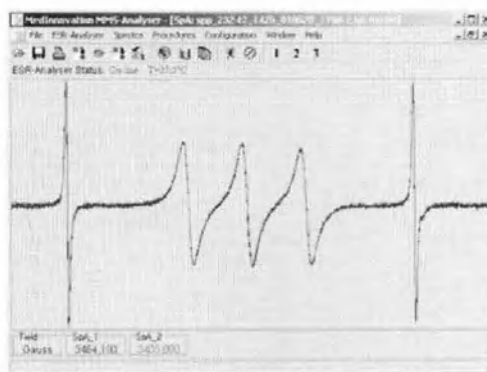
3.2.1. Пример. Анализ смеси свободных радикалов. Измерение концентрации.

ЭПР-спектр образца, содержащего спиртовой раствор 16-доксил-стеариновой кислоты, был измерен совместно с контрольным образцом, содержащим MgO с инкорпорированными ионами Mn^{2+} . Для этого капилляр с раствором был зафиксирован по оси стеклянной трубки, содержащей MgO.

Последующая процедура симуляции обеспечила точное совпадение экспериментального и модельного спектров:



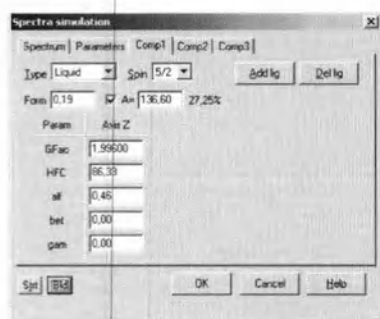
а) Экспериментальный спектр



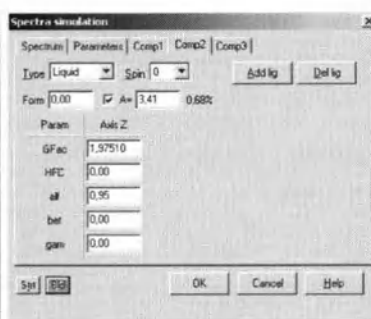
б) Совпадение экспериментального и модельного спектров

Рис. 8. ЭПР-спектр образца, содержащего спиртовой раствор 16-доксил-стеариновой кислоты, измеренный совместно с контрольным образцом, содержащим MgO с инкорпорированными ионами Mn^{2+} .

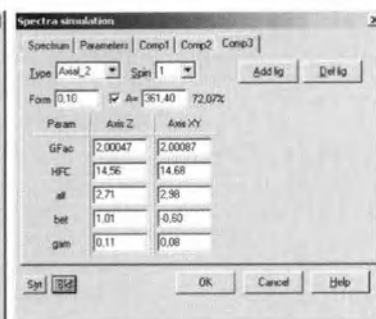
Соответствующая модель спектра состояла из трех различных компонент (Рис. 9):



Первая компонента



Вторая компонента



Третья компонента

Рис. 9. Параметры компонент модели ЭПР-спектра образца 16-доксил-стеариновой кислоты, измеренного совместно с контрольным образцом, содержащим MgO с инкорпорированными ионами Mn^{2+} .

Первая компонента имела относительную концентрацию 27,25% и соответствовала ЭПР-сигналу ионов Mn^{2+} контрольного образца, характеризующихся спином 5/2, g-фактором 1,996, константой СТС 86,33 Гс и шириной спектральной линии 0,46 Гс.

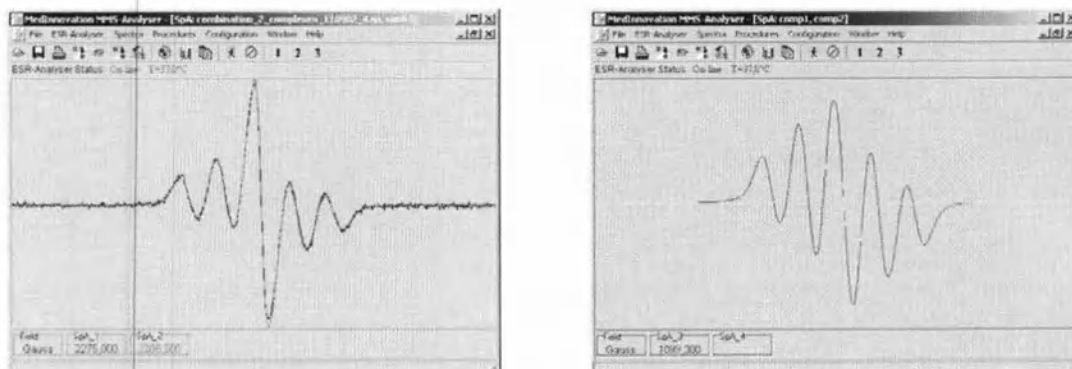
Вторая компонента с низкой относительной концентрацией 0,68% соответствовала ЭПР-сигналу запрещенных электронных переходов ионов Mn^{2+} (g-фактор 1,9751, ширина спектральной линии 0,95 Гс).

Третья компонента с относительной концентрацией 72,07% соответствовала спектральному триплету анизотропных доксил-радикалов, характеризующихся спином 1, g-тензором ($g_{zz} = 2,00047$, $g_{xx} = g_{yy} = 2,00087$), СТС тензором ($HFC_{zz} = 14,56$, $HFC_{xx} = HFC_{yy} = 14,68$ Гс) и набором из шести параметров, описывающих ширины спектральных линий триплет.

Таким способом относительная концентрация различных радикалов может быть оценена с высокой точностью. Описанная процедура может использоваться для калибровки растворов свободных радикалов.

3.2.2. Пример. Анализ состояния свободного радикала.

Был измерен ЭПР-спектр образца, содержащего радикалы 1,1-дифенил-2-пикрилгидразина (ДФПГ) в спиртово-водном растворе (объемное соотношение воды и этанола - 50:50).



а) Экспериментальный и модельный б) Две компоненты модельного спектра спектры

Рис. 10. ЭПР-спектр образца, содержащего радикалы 1,1-дифенил-2-пикрилгидразина (ДФПГ) в спиртово-водном растворе.

Спектр симулировали, используя модель с двумя различными компонентами (Рис. 11):



Рис. 11. Параметры компонент модели ЭПР-спектра образца, содержащего радикалы 1,1-дифенил-2-пикрилгидразина (ДФПГ) в спиртово-водном растворе.

Первая компонента (одиночная линия с g-фактором 2,0036 и шириной 2,34 Гс) соответствовала кластеру ДФПГ, сформированному 12% молекул ДФПГ.

Вторая компонента, соответствующая молекулам ДФПГ в истинном растворе (88%), характеризовалась тем же значением g-фактора 2,0036, меньшей шириной спектральной линии 2,04 Гс и сложной сверхтонкой структурой, отражающей влияние двух одинаковых атомов азота на электрон радикала.

3.2.3. Пример. Анализ кинетики свободных радикалов.

Изучение кинетики реакции требует измерения серий ЭПР-спектров. Для таких экспериментов образец должен быть помещен в резонатор Анализатора немедленно после смешивания анализируемых реагентов. Время смешивания реагентов должно быть отмечено для фиксирования начала реакции. Во время последовательного

измерения ЭПР-спектров изменения формы и интенсивности спектральной линии отражают ход реакции.

В описываемом примере командный файл „reaction.cmd“, находящийся в папке „CMD“ пакета программ MMSClient, использовался для обеспечения непрерывного последовательного измерения серий ЭПР-спектров и регистрации времени реакции. Спектры сохранялись автоматически (возможности программирования командных файлов и их использования для автоматизации измерений на Анализаторе описаны в Руководстве по использованию программного MMSClient).

Для данного эксперимента образец был приготовлен путем смешивания 1 мМ раствора ДФПГ в этаноле и вещества с антиоксидантными свойствами (в данном примере – с определенным сортом пива) в объемном отношении 5:1.

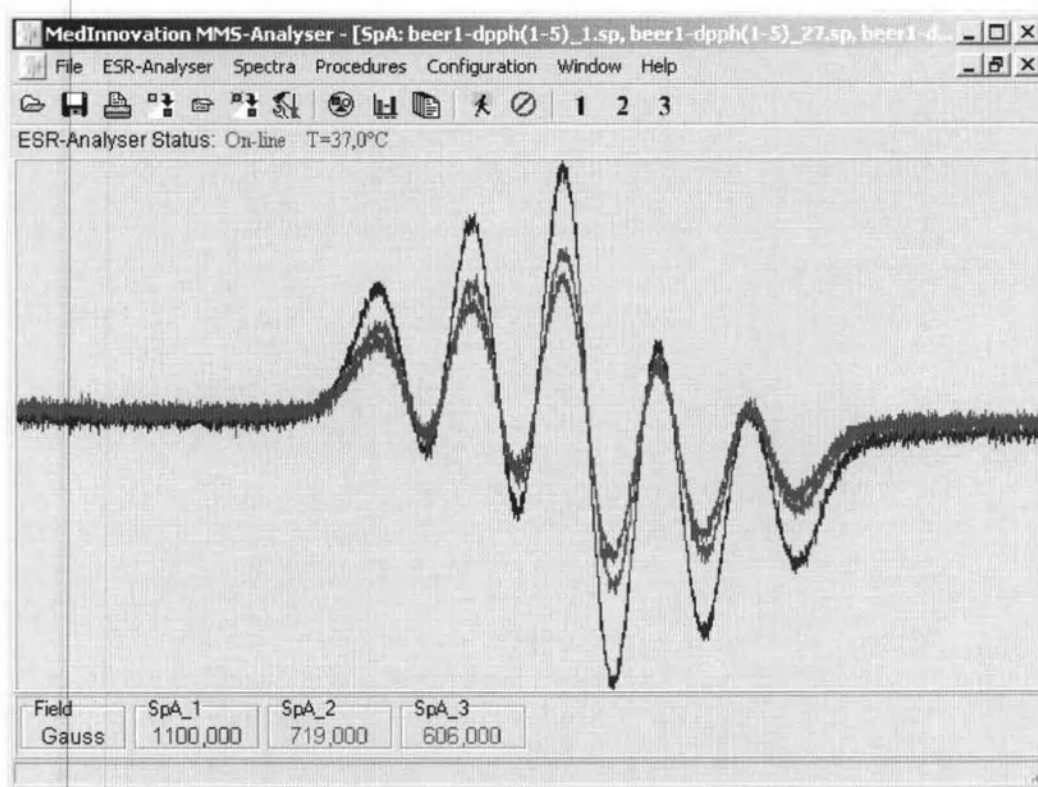


Рис. 12. Последовательно измеренные спектры раствора ДФПГ в этаноле, смешанного с образцом продукта (пива), содержащего антиоксиданты.

Спектр SpA_1 (с наибольшей интенсивностью) был измерен в течении 1 мин. после смешивания компонентов исследуемого образца. Спектры SpA_2 и SpA_3 (с меньшей интенсивностью) были измерены через 1000 и 2000 с соответственно. На следующей диаграмме показаны зависимости относительной интенсивности ЭПР-спектров от времени, характеризующие кинетику антиоксидантной реакции, измеренные для двух различных сортов пива.

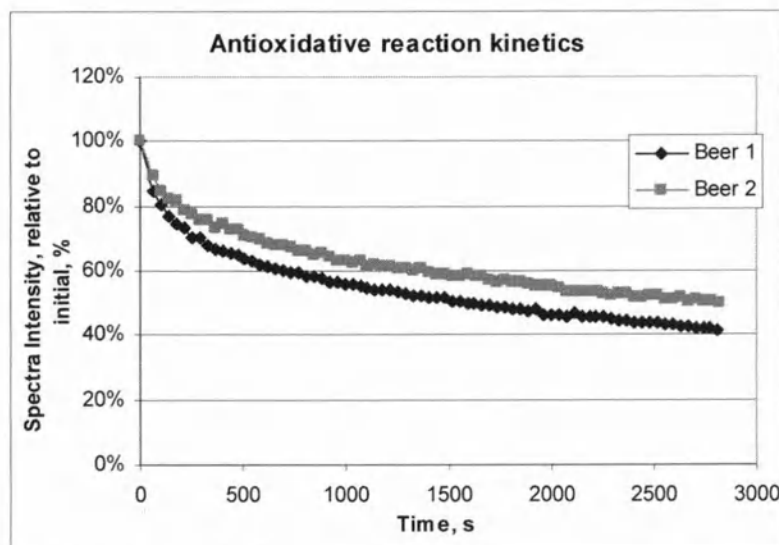


Рис. 13. Зависимость интенсивности ЭПР-спектра раствора ДФПГ в этаноле, смешанного с образцом продукта (пива), содержащего антиоксиданты.

Начальное значение интенсивности, принятое за 100% (соответствующее времени = 0 с), было определено дополнительным измерением ЭПР-спектра контрольного образца, содержащего раствор ДФПГ без добавления антиоксидантных веществ.

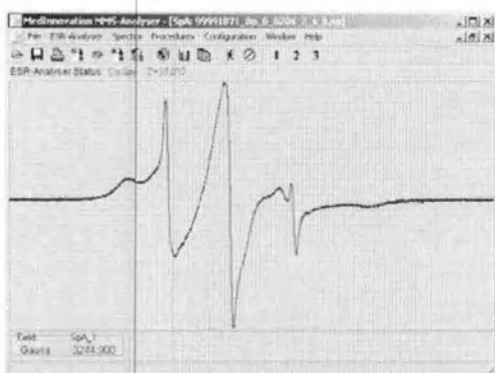
3.3. Использование Анализатора для биомедицинских исследований

Анализатор может применяться для исследования протеинов и других биомолекул с использованием ковалентных или нековалентных спиновых меток. При этом могут быть определены относительные концентрации спин-меченных молекул (спиновых проб), связанных на разных сайтах протеина, и параметры подвижности молекул спиновой пробы, такие как упорядоченность и время корреляции. Эти же параметры отражают конформацию сайтов связывания для спиновой пробы.

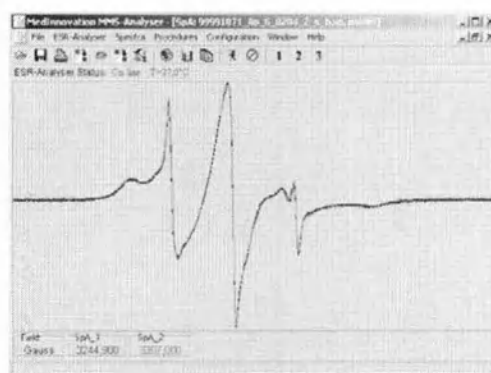
При протекании большинства заболеваний ткани организма производят ряд метаболитов, которые связываются с транспортными протеинами и нарушают их конформацию и связывающие свойства. Такие эффекты могут быть исследованы методом спиновых проб. Клиническую релевантность параметров протеина, измеренных методом ЭПР, следует определять в сравнительном изучении различных групп пациентов.

3.3.1. Пример. Анализ связывания спиновой пробы протеином.

ЭПР-спектр образца, содержащего 1,61 mM 16-доксил-стеариновой кислоты (16-ДС) как спиновой метки и 0,5 mM сывороточного альбумина, измеренный при 37° С, представлен на Рис. 14. Процедура симуляции спектра обеспечила точное соответствие экспериментального и модельного спектров.



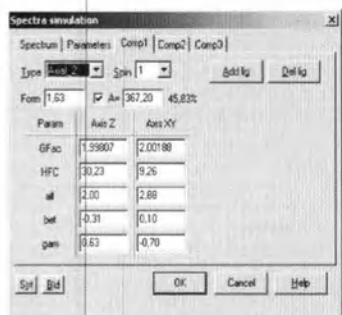
а) Экспериментальный спектр



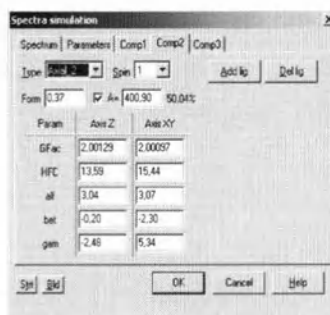
б) Экспериментальный и модельный спектры

Рис. 14. ЭПР-спектр образца, содержащего 1,61 mM 16-ДС как спиновой метки и 0,5 mM сывороточного альбумина, измеренный при 37° С.

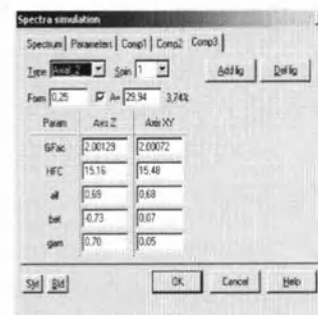
Соответствующий модельный спектр состоял из трех различных компонент (Рис. 15):



Первая компонента



Вторая компонента



Третья компонента

Рис. 15. Форма (вверху) и параметры (внизу) ЭПР-спектра образца, содержащего 1,61 mM спиновой зонда 16-ДС и 0,5 mM сывороточного альбумина, измеренного при 37° С.

Первая компонента, составившая 45,8% от общей интенсивности спектра, характеризовалась высокой анизотропией ($g_z = 1,998$, $g_{x,y} = 2,0019$; $A_z = 30,23$ Гс, $A_{x,y} = 9,26$ Гс). Это отражало высокую упорядоченность молекул спиновой пробы; наиболее вероятная интерпретация этого - это их сильная фиксация в узких ячейках, где их движение ограничено осцилляцией вдоль оси, определяемой углеводородной цепочкой.

Подвижность молекул спиновой пробы второй фракции (50%) ($g_z = 2,0013$, $g_{x,y} = 2,0009$; $A_z = 13,6$ Гс, $A_{x,y} = 15,4$ Гс) связана с медленным изотропным вращением. Это свидетельствовало об их иммобилизации на другом связывающем сайте.

Только около 4% молекул спиновой пробы соответствовало третьей фракции ($g_z = 2,0013$, $g_{x,y} = 2,0007$; and $A_z = 15,2$ Гс, $A_{x,y} = 15,5$ Гс). Эта компонента отражала свободное вращение несвязанных молекул.

Измерение ширины линий (W_L для левой линии, W_C для центральной и W_H для правой линии) для этих спектральных компонент дало следующие значения:

первая компонента: $W_L = 15,5$ Гс; $W_C = 6,5$ Гс; $W_H = 27,3$ Гс;

вторая компонента: $W_L = 3,2$ Гс; $W_C = 3,2$ Гс; $W_H = 4,6$ Гс;

третья компонента: $W_L = 1,2$ Гс; $W_C = 1,2$ Гс; $W_H = 1,3$ Гс.

Используя эти значения и известную формулу

$$\tau_i = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot W_C \cdot \left(\frac{W_H}{W_C} + \frac{W_L}{W_C} - 2 \right),$$

были рассчитаны значения времен корреляции τ_i для трех пулов молекул спиновой пробы: $\tau_1 = 1,9 \cdot 10^{-8}$ с; $\tau_2 = 9,1 \cdot 10^{-10}$ с; $\tau_3 = 6,5 \cdot 10^{-11}$ с.

Изотропные константы A_0 сверхтонкой структуры, характеризующие полярность окружения радикалов и способность молекул среды образовывать водородную связь с NO-группой, были рассчитаны как

$$A_0 = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3.$$

Известные значения параметров тензора сверхтонкой структуры для кристалла молекул 16-ДС составляют $A_z^{\text{crystal}} = 32,9$ Гс, $A_y^{\text{crystal}} = 5,4$ Гс, $A_x^{\text{crystal}} = 5,9$ Гс, дающие в результате $A_0^{\text{crystal}} = 14,73$ Гс.

Исходя из этого, полезные параметры P_i , характеризующие отношение полярности окружения радикала в анализируемой пробе к полярности в кристалле, составили $P_1 = A_0^{(1)}/A_0^{\text{crystal}} = 1,10$; $P_2 = 1,01$; $P_3 = 1,05$.

Эти значения указали на некоторые различия в окружении молекул спиновой пробы в различных сайтах протеина.

Фактор упорядоченности S_i , характеризующий свободу движения несвязанной молекулы спиновой пробы, был определен с помощью выражения

$$S_i = \frac{A_{zz} - 0,5 \cdot (A_{xx} + A_{yy})}{A_0} \times \frac{A_0^{\text{Cristal}}}{A_{zz}^{\text{Cristal}} - 0,5 \cdot (A_{xx}^{\text{Cristal}} + A_{yy}^{\text{Cristal}})},$$

обеспечивающего $S_i = 0$ для абсолютно свободных молекул и $S_i = 1$ для строго фиксированных молекул кристалла.

Расчет дал следующие значения $S_1 = 0,71$; $S_2 = -0,07$; $S_3 = -0,01$. Отрицательное значение S_3 объясняется неточностью измерений, значение $S_2 = -0,07$ указало на возможную неточность примененного модельного спектра.

Для более точного анализа свободы спиновой пробы, в расчете фактора упорядоченности должно быть учтено движение самой молекулы протеина:

$$S_i = \frac{A_{zz} - 0,5 \cdot (A_{xx} + A_{yy}) + 1,5 \cdot \left(\frac{1,1 \cdot 10^{-7}}{\tau} \right)^{2/3}}{A_0} \times \frac{A_0^{\text{Cristal}}}{A_{zz}^{\text{Cristal}} - 0,5 \cdot (A_{xx}^{\text{Cristal}} + A_{yy}^{\text{Cristal}})},$$

где τ - время корреляции вращения глобулы. Значение τ для альбумина в сыворотке или подобной среде составляет 35 нс.

В результате применения последней формулы, были получены следующие значения фактора упорядоченности: $S_1 = 0,80$; $S_2 = 0,18$; $S_3 = 0,12$.

Таким образом, принимая в расчет структуру молекул спиновой пробы, можно заключить, что 16-ДС связалась в двух существенно различных сайтах альбумина, в соотношении 46% к 50%.

В первичном сайте связывания движение молекул спиновой пробы было анизотропным и было ограничено осцилляцией вдоль оси сайта ($S_1 = 0,8$; $\tau_1 = 1,9 \cdot 10^{-8}$ s), что указывает на то, что конформация данного сайта подобна узкой длинной ячейке с диаметром 5 – 7 Å и длиной более 10 Å.

Движение молекул спиновой пробы во втором сайте характеризовалось как медленное малоупорядоченное вращение ($S_2 = 0,18$; $\tau_2 = 9,1 \cdot 10^{-10}$ s), что, вероятно, соответствует вторичному сайту, сформированному широким внутриглобулярным пространством с диаметром более 20 Å.

Различные значения полярности окружения, $P_1 = 1,10$ и $P_2 = 1,01$, также указали на различную структуру этих сайтов.

Третий пул молекул спиновой пробы (4%), вероятно, соответствовал несвязанной 16-ДС ($S_3 = 0$; $\tau_3 = 6,5 \cdot 10^{-11}$ s) или молекулам, нежестко ассоциированным на поверхности глобулы ($S_3 = 0,12$; $\tau_3 = 6,5 \cdot 10^{-11}$ s).

4. Специальные функции Анализатора

4.1. MMS-исследование альбуминосодержащих образцов

4.1.1. Принцип MMS-исследования

Определение показателей функциональности сывороточного альбумина с помощью набора реагентов „MMS-kit-SA01“ – так называемое MMS-исследование (MMS – аббревиатура от англ. "mobility of molecular structure") – основано на методе спиновых зондов, теория и методики применения которого описаны в следующих книгах: 1) *Метод спиновых меток в молекулярной биологии*. Лихтенштейн Г.И. М., „Наука“, 1974; 2) *Метод спинового зонда*. Кузнецов А.Н. М., „Наука“, 1976; 3) *Метод спиновых меток*. Под ред. Л. Берлинера. М. „Мир“, 1979).

Метод определения показателей функциональности сывороточного альбумина соответствует Европейскому Патенту EP 1269213 и Патенту России RU 2275648, и состоит в следующем:

- в исследуемой пробе индуцируют целенаправленные конформационные изменения молекул альбумина, для чего к трем аликвотам пробы добавляют три различных концентрации связывающегося с альбумином спинового зонда и дополнительно три различных концентрации этанола.
- Из ЭПР-спектров аликвот со спиновым зондом и этанолом, на основе компьютерной имитации и фитинга спектров ЭПР, определяют степень изменения параметров связывания спинового зонда в центрах связывания альбумина в зависимости от концентрации спинового зонда и концентрации этанола.
- Изменения транспортных свойств альбумина рассчитывают на основе изменений значений параметров связывания спинового зонда в зависимости от концентрации спинового зонда и этанола.

4.1.2. Условия проведения исследования

MMS-исследование должно проводиться при следующих условиях окружающей среды:

- температура в помещении: (15 – 25) °C;
- атмосферное давление: (101,3 ± 15,4) кПа (760 ± 116 мм рт.ст.);
- относительная влажность: (20 – 75) %.

4.1.3. Исследуемые образцы

Для проведения MMS-исследования используют три набранные в стеклянные капилляры аликвоты пробы сыворотки или плазмы крови, подготовленные с помощью набора реагентов „MMS-kit-SA01“ фирмы MedInnovation GmbH в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов.

Перед началом измерений необходимо удостовериться, что капилляры готовы к измерениям, а именно:

- в жидкости капилляра отсутствуют пузырьки;
- жидкий образец занимает не менее 50 мм длины капилляра и располагается на расстоянии 5 – 10 мм от нижнего конца капилляра (Рис. 16). Последнее обеспечивает необходимый резерв длины для небольших перемещений жидкости в закупоренном капилляре, что важно для предотвращения вытекания содержимого при последующих действиях;
- замазка надежно закупоривает капилляр, что предотвращает вытекание содержимого капилляра.

- капилляр зафиксирован в резиновой пробке, как показано на Рис. 16.



Рис. 16. Позиция исследуемого жидкого образца в стеклянном капилляре.

4.1.4. Проверка чистоты резонатора и ампулы

- Удостоверьтесь, что пустая стеклянная ампула с держателем правильно вставлена в резонатор.
- Выберите „Measuring cell purity check“ в меню „Procedures“ программы MMSCClient.

Программа произведет сканирование базовой спектральной линии, коротая должна состоять только из шумовой компоненты и не должна содержать каких-либо типичных спектральных линий.

В случае обнаружения спектральных линий паразитного сигнала, ампула должна быть очищена снаружи и изнутри с помощью стержня с ватным наконечником. В случае значительных загрязнений промойте ампулу 0,9% раствором NaCl либо этанолом. Повторите проверку чистоты ампулы и резонатора. В случае если искажение базовой линии не может быть устранено, обратитесь в службу сервиса MedInnovation GmbH.

Измерения проводятся корректно только в случае, если базовая линия не содержит паразитных сигналов. Во время измерений, ампула должна постоянно оставаться установленной в резонаторе, кроме случаев когда ампулу необходимо очистить.

4.1.5. Проведение MMS-исследования

- Нажмите кнопку „Screening“ на панели инструментов программы MMSCClient, чтобы начать процедуру исследования. Программа откроет маску для ввода информации об образце. Заполнение поля „Probe_code“ — обязательно, остальных полей — необязательно. Нажмите „Enter“ чтобы закрыть маску ввода и перейти к процедуре измерений.
- Поместите капилляр в стеклянную ампулу, установленную в резонатор. Держите капилляр за резиновую пробку, которая предохраняет капилляр от проваливания внутрь ампулы.

Замечание. Перед помещением капилляра в Анализатор удостоверьтесь, что стеклянная ампула установлена в резонатор. Если ампула установлена непосредственно перед измерением, подождите около 3 минут до начала регистрации спектра (это необходимо для достаточной стабилизации температуры образца). Помещение образцов или капилляров непосредственно в резонатор (без стеклянной ампулы) недопустимо, так как может привести к повреждению Анализатора!

- Нажмите кнопку „A“, „B“ или „C“, соответствующую капилляру с аликвотой, которая должна быть измерена.
- Начало измерения спектра будет задержано автоматически на 30 секунд для прогрева образца.

- Для каждого капилляра программа выполняет три измерения спектра, каждое измерение длится 60 с. Измерения заканчиваются звуковым сигналом и индицируемой формой с кнопками „А“, „В“, „С“. После измерения программа также выполняет обработку спектра путем подгонки модели (визуально это соответствует сближению синих и красных спектральных линий) и сохраняет спектр. После этого Анализатор готов к измерению со следующим капилляром (кнопки, соответствующие уже измеренным аликвотам индицируются зеленым цветом).
- Поместите следующий капилляр в стеклянную ампулу, и начните измерение нажатием на кнопку, соответствующую установленному капилляру. Во время смены капилляров убедитесь, что содержимое предыдущего капилляра не вытекло. В случае утечки части или всего образца в ампулу, протрите ампулу стержнем с ватным наконечником. В случае сильного загрязнения очистите ампулу 0,9% физиологическим раствором. После установки ампулы в Анализатор перед следующим измерением подождите 3 минуты (для стабилизации температуры образца). Выполните проверку чистоты стеклянной ампулы в соответствии с пунктом 4.1.4. В случае необходимости повторите измерение для потерянной аликвоты, включая приготовление аликвоты согласно инструкции по применению набора реагентов „MMS-kit-SA01“.
- В конце измерения серии из трех аликвот нажмите кнопку „Finish“. После этого в появившейся форме информация об образце может быть дополнена и/или исправлена. После этого нажмите „Exit“ для выхода из процедуры или „MMS Test Result“ для просмотра результатов измерения. Программа сохраняет измеренные данные в текстовом файле с автоматически генерируемым названием в поддиректории, соответствующей текущей дате, в папке для сохранения результатов измерений. Путь к этой папке задается в поле „Result folder“ в закладке „Others“ формы „General“, вызываемой в меню „Configuration“. Спецификация текстового файла описана в пункте 4.1.8.

4.1.6. Окно результатов MMS-исследования

- Откройте окно результатов нажатием кнопки „MMS Test Result“ непосредственно после измерения образца. Также, вы можете просмотреть результаты ранее исследованных образцов, нажав кнопку „Open MMS Test result“, найдя необходимый файл результатов и нажав кнопку „MMS Test result“.
- Окно результатов содержит в левой части информацию о пациенте и исследованном образце, а в правой части результаты исследования, в частности значения параметров DR, BE, RTQ и DTE. В нижней части формы отображается дополнительная информация о пациенте или образце.
- Распечатайте результаты нажатием кнопки „Print“.

4.1.7. Создание таблицы из набора файлов результатов MMS-исследования

- Нажмите кнопку „Create MMS test summary file“ на панели инструментов программы MMSCient.
- Выберите папку, содержащую файлы результатов MMS-исследования (файлы формата *.txt), из которых необходимо сформировать общую таблицу. Затем нажмите „OK“. Пожалуйста, удостоверьтесь, что выбранная папка не содержит других файлов формата *.txt, кроме файлов с результатами MMS-исследования. В противном случае таблица может быть создана некорректно.
- Выберите папку, куда должна быть помещена таблица результатов, затем нажмите „OK“.
- В появившейся маске ввода введите имя файла для создаваемой таблицы, затем нажмите „OK“.

- После этого, файл таблицы, также в формате *.txt, будет создан в выбранной папке.
- Спецификация полей таблицы описана в пункте 4.1.8.

4.1.8. Описание текстовых файлов результатов MMS-исследования

Опытные пользователи ПК также имеют возможность обрабатывать файлы результатов MMS-исследования без использования программы MMSClnt.

Текстовые файлы результатов (см. пункт 4.1.6) и таблица результатов (см. пункт 4.1.7) сохраняются в формате, в котором поля разделены символом табуляции. Для корректного отображения эти файлы должны открываться программами, пригодными для редактирования таблиц (к примеру Microsoft® Excel). Пожалуйста, не редактируйте и не сохраняйте исходные текстовые файлы результатов MMS-исследования при их просмотре (это не касается таблиц, созданных согласно п. 4.1.7)!

Текстовый файл результата MMS-исследования содержит следующие строки:

- Строка № 1 – версия файлового формата;
- Строка № 2 – сотрудник, выполнявший измерения;
- Строки №№ 3-4 – сервисные строки;
- Строка № 5 – заголовок таблицы, содержащей информацию об образце и пациенте;
- Строка № 6 – таблица, содержащая информацию об образце и пациенте;
- Строка № 7 – заголовок таблицы содержащей спектральные параметры;
- Строки №№ 8-х – таблица, содержащая спектральные параметры (число строк зависит от количества измеренных спектров);
- Строка, содержащая слово „Information“ – начало раздела, содержащего дополнительную информацию об образце и пациенте;
- Строка, содержащая слова „MMS Test results“ – начало секции результатов MMS-исследования;
- Последние две строки – обозначение параметров результатов MMS-исследования и их значения.

Таблица, с результатами измерений нескольких образцов, содержит :

- Строка № 1 – заголовок таблицы, содержащей информацию об образце и пациенте, спектральные параметры, а также параметры результатов MMS-исследования;
- Строки № 2-х – таблица, содержащая информацию об образце и пациенте, измеренные спектральные параметры, а также параметры результатов MMS-исследования; каждая строка соответствует одному измеренному образцу.

Заголовки таблиц, содержащих информацию об образце и пациенте, спектральные параметры и параметры результатов MMS-исследования, содержат:

- Probe_code – идентификационный код измеренного образца;
- Device – серийный номер Анализатора;
- Patients_code – идентификационный код пациента;
- Type_proc – тип измерительной процедуры, обычно „3P“ – процедура с тремя измеряемыми спектрами;
- Number – номер вызовы процедуры MMS-исследования, проводимой на данном Анализаторе, инкрементируется автоматически после каждого MMS-исследования;
- path_probe – конечная часть пути к файлу, в котором сохранялись ЭПР-спектры;
- date – дата измерения;
- material – сведения о материале образца (например, сыворотка („s-“) или плазма („p-“), нативная („n-“) или замороженная („fr-“));
- source – организация или подразделение, предоставившее образец;

- sex – пол пациента;
- age – возраст пациента;
- Calbumin – концентрация альбумина в измеряемом образце (по умолчанию 40 г/л);
- Spin_probe_No – идентификационный код использованного набора реагентов;
- Point_Proc – тип аликвоты („А“, „В“ или „С“);
- Error – служебное поле, используемое для сохранения информации об ошибках в процессе измерений;
- Factor – служебное поле;
- Real_Sp – имя файла, содержащего ЭПР-спектр;
- Time – точное время окончания измерения спектра;
- Date – дата измерения спектра;
- Csound/Calbumin – отношение концентрации спинового зонда к концентрации альбумина в измеренной аликвоте;
- Calcohol – объемная концентрация этанола в измеренной аликвоте;
- C1 – доля первой спектральной компоненты;
- C2 – доля второй спектральной компоненты;
- C3 – доля третьей спектральной компоненты;
- 1.S – показатель упорядочивания молекул спиновой пробы первой фракции;
- 2.S – показатель упорядочивания молекул спиновой пробы второй фракции;
- 1.Tg – время корреляции глобулы альбумина рассчитанной по первой фракции спиновой пробы;
- 2.Tg – время корреляции глобулы альбумина рассчитанной по второй фракции спиновой пробы;
- 1.H – показатель гидрофильности окружения молекул спиновой пробы первой фракции;
- 2.H – показатель гидрофильности окружения молекул спиновой пробы второй фракции;
- C4 – доля четвертой спектральной компоненты;
- C5 – доля пятой спектральной компоненты;
- Intensity – интегральная интенсивность спектра;
- Alfa – дополнительная геометрическая характеристика спектра;
- Model – имя файла модели спектра, использованной для симуляции;
- Temperature – температура образца, измеренная в момент окончания регистрации спектра;
- BE – эффективность связывания;
- DR – дискриминантный параметр;
- RTQ – реальное качество транспорта;
- DTE – детоксификационная эффективность.

4.2. Оценка концентрации растворов спинового зонда

Описанная ниже методика обеспечивает оценку концентрации раствора 16-доксил-стеариновой кислоты (спиновый зонд) в этаноле с помощью тест-системы типа TSI-xx, поставляемой в комплекте к Анализатору.

4.2.1. Принцип оценки

Концентрация раствора спинового зонда оценивается с помощью сравнения интегральных интенсивностей ЭПР-спектров исследуемого раствора и стабильных ионов Mn^{2+} , внедренных в MnO , контрольного образца.

4.2.2. Оцениваемые растворы

Объектом оценки являются растворы 16-доксил-стеариновой кислоты в этаноле с концентрацией от 3×10^{-3} моль/л до 8×10^{-3} моль/л, входящие в состав набора реагентов „MMS-kit-SA01“ и используемые для MMS-исследования.

4.2.3. Условия проведения

Оценка концентрации растворов спинового зонда должна проводиться при следующих условиях окружающей среды:

- температура в помещении: $(15 - 25) ^\circ C$;
- атмосферное давление: $(101,3 \pm 15,4)$ кПа (760 ± 116 мм рт.ст.);
- относительная влажность: $(20 - 75) \%$.

4.2.4. Проверка чистоты тест-системы и резонатора

- Установите тест-систему в отверстие для образца.

Внимание! После установки тест-системы в Анализатор необходимо сделать паузу около 10 минут для стабилизации температуры в системе термостатирования образца.

- Выберите пункт „Spin probe proving“ в меню „Procedures“.
- В выпадающем меню окна „Spin Probe Solution Proving“ выберите идентификатор тест-системы, соответствующий ярлыку на используемой тест-системе.
- Выберите опцию „Test-tube purity“ и нажмите кнопку „Next“.
- Убедитесь, что ваша тест-система правильно установлена в Анализатор и нажмите кнопку „Next“.
- Программа автоматически измерит и обработает два ЭПР-спектра.
- После завершения измерения спектров и их обработки программа выведет окно с результатом „MMS Spin Probe Proving Result“.
- Сообщение „Purity test OK“ означает, что трубка тест-системы не содержит заметных количеств посторонних веществ, обладающих ЭПР-сигналом.
- Сообщение „Repeat cleaning“ означает, что трубка тест-системы содержит загрязнения, обладающие ЭПР-сигналом, и должна быть очищена. Для этого трубку тест-системы необходимо аккуратно протереть изнутри и снаружи смоченной этанолом ватой на стержне для чистки ампул и выждать 2 минуты. После очистки повторите процедуру проверки чистоты тест-системы и резонатора.

4.2.5. Наполнение капилляра раствором спинового зонда

- Заполните стеклянный капилляр примерно 50 мкл раствора спинового зонда (Рис. 17).
- Снизу закройте капилляр воском.
- Сверху наденьте на капилляр пробку.

- Аккуратно вставьте капилляр в тест-систему, заранее установленную в резонатор Анализатора.

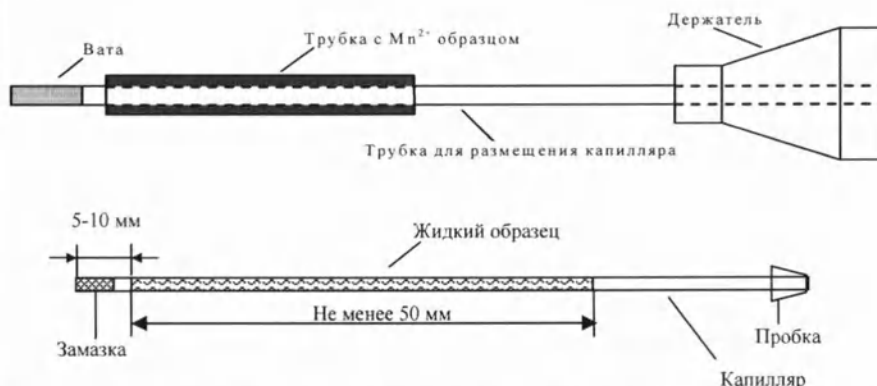


Рис. 17. Тест-система (вверху) и капилляр (внизу), подготовленный для измерений.

4.2.6. Автоматическая оценка концентрации спинового зонда

- Выберите пункт „Spin probe proving“ в меню „Procedures“.
- Выберите опцию „Spin probe solution proving“.
- Введите текстовый идентификатор проверяемого раствора в поле „Probe code“.
- Проверьте, что число, индицируемое в поле „Capillary effective length, mm“ (эффективная длина капилляра, мм), соответствует используемому капилляру. Эффективная длина капилляра должна измеряться один раз для партии капилляров, как показано на Рис. 18 – между меткой 40 мкл и нижним срезом капилляра. Неточность измерения длины не должна превышать 0,5 мм. Коррекция этой величины необходима только для учета вариаций диаметра капилляров от партии к партии.

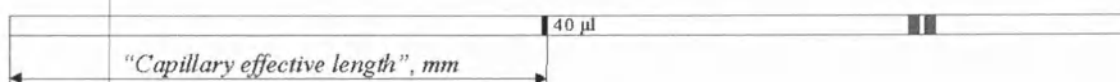


Рис. 18. Измерение эффективной длины капилляра

- Нажмите кнопку „Next“. Начнется автоматическая процедура оценки концентрации раствора спинового зонда.
- После регистрации первых четырех спектров будет выведено диалоговое окно с требованием повернуть тест систему.
- Тест-система должна быть аккуратно повернута по часовой стрелке приблизительно на прямой угол ($90^\circ \pm 10^\circ$). После поворота тест-системы нажмите „Next“. Будут выполнены измерения следующих четырех спектров.
- В течение всей процедуры запрос на поворот тест-системы появляется три раза. Каждый раз тест-система должна быть повернута по часовой стрелке приблизительно на прямой угол.
- После измерений ЭПР-спектров при четырех различных ориентациях тест-системы будет выведено окно с результатом оценки концентрации „MMS Spin Probe Proving Result“.
- Окно „MMS Spin Probe Proving Result“ содержит общую информацию и результат оценки концентрации раствора 16-доксил-стеариновой кислоты.

- Значение параметра „Factor“ показывает отношение концентрации 16-доксил-стеариновой кислоты к значению $3,5 \times 10^{-3}$ моль/л. Чтобы определить абсолютную концентрацию параметр „Factor“ должен быть умножен на 0,0035 (Измеренная концентрация [моль/л] = „Factor“ $\times 3,5 \times 10^{-3}$).

Растворы спинового зонда набора реагентов „MMS-kit-SA01“ пригодны для проведения MMS-исследований при следующих значениях параметра „Factor“:

Для раствора S1 (3,5 ммоль/л): Factor = $1 \pm 0,05$;

Для раствора S2 (5,8 ммоль/л): Factor = $1,66 \pm 0,08$;

Для раствора S3 (7,5 ммоль/л): Factor = $2,14 \pm 0,10$.

- Параметр „Standard Error“ отражает погрешность измерения. По умолчанию, если значение параметра „Standard Error“ слишком велико, выводится сообщение „Repeat test“, означающее рекомендацию повторить оценку концентрации спинового зонда.
- Нажмите „Print“, если вы хотите распечатать отчет с результатом оценки концентрации.
- Нажмите „Exit“ для завершения процедуры. Файл отчета сохраняется в поддиректории „SoundCtrl\Г\М\Ч“ (где Г=Год, М=Месяц, Ч=Число) папки для сохранения результатов измерений. Путь к этой папке задается в поле „Result folder“ в закладке „Others“ формы „General“, вызываемой в меню „Configuration“
- Чтобы просмотреть или распечатать файл отчета процедуры оценки концентрации, которая была выполнена ранее, выберите пункт „Open spin probe proving report file...“ в меню „Procedures“.

5. Техническое обслуживание

Принципиально, прибор не требует технического обслуживания. Однако, необходима периодическая чистка внешних панелей и вентиляционных решеток.

Для наружной чистки используйте сухую неворсистую ткань. В случае необходимости влажной очистки убедитесь, что прибор отключен от электросети и не используйте химические средства.

Чистку прибора внутри может производить только специалист службы сервиса, т.к. открытие прибора пользователем или неавторизованным лицом не разрешается. В связи с этим, для измерений предпочтительно использование одноразовых капилляров и ампул. Для предотвращения загрязнения измерительного резонатора капилляры должны помещаться в Анализатор только внутри прозрачной стеклянной или пластиковой ампулы.



Попадание жидкости внутрь Анализатора или на порты и штекеры недопустимо!

6. Сервисное обслуживание

Рекомендуется проведение генеральной проверки прибора специалистом фирмы MedInnovation GmbH каждые 2 года эксплуатации.

7. Утилизация

Утилизация материалов и образцов, использованных в исследованиях, проводится согласно действующим лабораторным правилам и нормам охраны окружающей среды.

Анализатор произведен из материалов, которые могут быть утилизированы соответствующими службами безопасно для окружающей среды. В случае возникновения вопросов, касающихся утилизации, пожалуйста, обращайтесь в сервисную службу фирмы MedInnovation GmbH:

MedInnovation GmbH, ESR-Analyselabor
Freiheitstrasse 124/126
D-15745 Wildau

Телефон: +49-3375-213000
Факс: +49-3375-213033
Email: info@medinnovation.de

8. Действия в случае возникновения неполадок

Проблема	Действия
Анализатор не включается	- Проверьте, включен ли источник бесперебойного питания. - Проверьте соединение между Анализатором и источником бесперебойного питания.
Сообщения об ошибках: "Wrong firmware checksum. Reprogramm main proc." "Can not align UHF drives"	- Выключите и включите Анализатор. - Если сообщение повторилось снова, пожалуйста, сообщите об этом в сервисную службу MedInnovation GmbH.
Сообщения об ошибках: "ESR analyser internal error" "Error in field setting" "Can not terminate scanning in analyser"	- Выключите и включите Анализатор.
Сообщения об ошибках: "Communication error" "Can not initialize RS232" "Can not write data to RS232" "Can not read data from RS232" "Can not read ADC data from analyser"	- Проверьте, включен ли Анализатор. - Проверьте соединение между Анализатором и ПК. - Проверьте, правильный ли номер COM-порта указан в форме "General \ Analyser" меню "Configuration". - Проверьте, верны ли установки COM-порта в операционной системе Microsoft® Windows (Мой компьютер -> Свойства -> Оборудование -> Управление устройствами).
Сообщения об ошибках: "Compensation error" "Adjustment lost during scanning" "Adjustment error" "Can not find frequency by resonator" "Can not find frequency by generator" "Can not find couple position" "Can not justify frequency position" "Can not find phase position"	- Проверьте, правильность установки измеряемого образца. - Перезапустите процедуру регистрации спектра или процедуру настройки Анализатора. - Установите более высокое значение параметра "UHF Power Attenuation" форме "Settings \ Parameters" меню "ESR-Analyser". - Попробуйте использовать ампулу или капилляр меньшего диаметра.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Калибровка Анализатора

Калибровка контроллера магнитного поля

1. Включить Анализатор.
2. Запустить программу MMSCLIENT в режиме Extended.
3. Вставить контрольный образец типа RS1-xx в Анализатор.
4. Выждать 1 час.
5. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / MW“, в поле редактирования „Attenuation at max. Mn2+ signal“ прочесть величину PMn. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Field“, в поле редактирования „H0:“ прочесть величину H01.
6. Нажать кнопку „Fine“.
7. В диалоговом окне „Distance between 1st & 6th Mn2+ lines, G“ ввести число 433,89. В диалоговом окне „Modulation, G“ ввести число 1. В диалоговом окне „Attenuation, dB“ ввести число PMn (см. пункт 5). Выждать завершения регистрации спектров.
8. Подтвердить изменение калибровочных коэффициентов контроллера магнитного поля.
9. Вынуть контрольный образец типа RS1-xx из Анализатора. Поместить контрольный образец типа RS3-xx в ампулу с держателем. Вставить ампулу с держателем в Анализатор.
10. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Parameters“ и ввести следующие величины:

Middle of range	H ₀₁
Scan range	150
Modulation	0,1
Time, s	100
Number	1
Attenuation, dB	0
Gain	1
Phase	0
Time constant, s	0

11. Нажать кнопку „Scan“. Выждать завершения регистрации спектра. Должен быть зарегистрирован ЭПР-спектр с одиночной спектральной линией; в противном случае увеличить в 2 раза параметр „Scan Range“ и повторить регистрацию.
12. Открыть пункт меню „Spectra / Processing / Line“, в информационном окне „Line parameters“ прочесть величину H02 (обозначенную „Position“).
13. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Field“, ввести число H02 в окно редактирования „H0:“.
14. Нажать кнопку „To device“.

Калибровка модулятора магнитного поля

1. Включить Анализатор.
2. Запустить программу MMSCLIENT в режиме Extended.
3. Вставить контрольный образец типа RS1-xx в Анализатор.
4. Выждать 1 час.

5. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / MW“, в поле редактирования „Attenuation at max. Mn2+ signal“ прочитать величину PMn.
6. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Field“ и нажать кнопку „Modul“.
7. В диалоговом окне „Distance between 1st & 6th Mn2+ lines, G“ ввести число 433,89. В диалоговом окне „Modulation, G“ ввести число 1. В диалоговом окне „Attenuation, dB“ ввести число PMn (см. пункт 5). Выждать завершения регистрации спектров.
8. Подтвердить изменение калибровочных коэффициентов модулятора магнитного поля.
9. Нажать кнопку „To device“.

Калибровка аттенюатора СВЧ

1. Включить Анализатор.
2. Запустить программу MMSCLIENT в режиме Extended.
3. Поместить контрольный образец типа RS3-xx в ампулу с держателем. Вставить ампулу с держателем в Анализатор.
4. Выждать 1 час.
5. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / MW“, в рамке „Dependence“ в поле редактирования „Max. code“ прочитать величину CMAX. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Field“, в поле редактирования „H0:“ прочитать величину H0.
6. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Parameters“ и ввести следующие величины:

Middle of range	H ₀
Scan range	30
Modulation	0,1
Time, s	30
Number	1
Attenuation, dB	0
Gain	1
Phase	0
Time constant, s	0

7. Нажать кнопку „Scan“. Выждать завершения регистрации спектра.
8. Увеличить величину параметра „Modulation“ и повторить регистрацию спектра, если амплитуда спектра ДФПГ меньше, чем 5000 (амплитуда спектра примерно пропорциональна величине параметра „Modulation“). Уменьшить величину параметра „Modulation“ и повторить регистрацию спектра, если амплитуда спектра ДФПГ больше, чем 12000.
9. Повторить пункт 8, если амплитуда спектра ДФПГ находится не в диапазоне 5000..12000.
10. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / MW“ и нажать кнопку „Power“. Ответить „Yes“ на вопрос „Have you registered single line just now?“. В диалоговом окне „Attenuation maximum code“ ввести число CMAX (см. пункт 5). Выждать завершения измерений.
11. Если число в диалоговом окне „Points“ в рамке „Dependence“ больше, чем 50, нажмите кнопку „Optimize“. В диалоговом окне „Input maximum difference, dB“ введите число 0,2. Подтвердите выполнение оптимизации, если новое число точек меньше или равно 50. Отмените выполнение оптимизации, если новое число точек больше 50, и повторите этот пункт, вводя большее число в диалоговом окне „Input maximum difference, dB“.

12. Нажать кнопку „To device“.
13. Вынуть контрольный образец типа RS3-xx из Анализатора. Поместить контрольный образец типа RS1-xx в Анализатор.
14. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Parameters“ и ввести следующие величины:

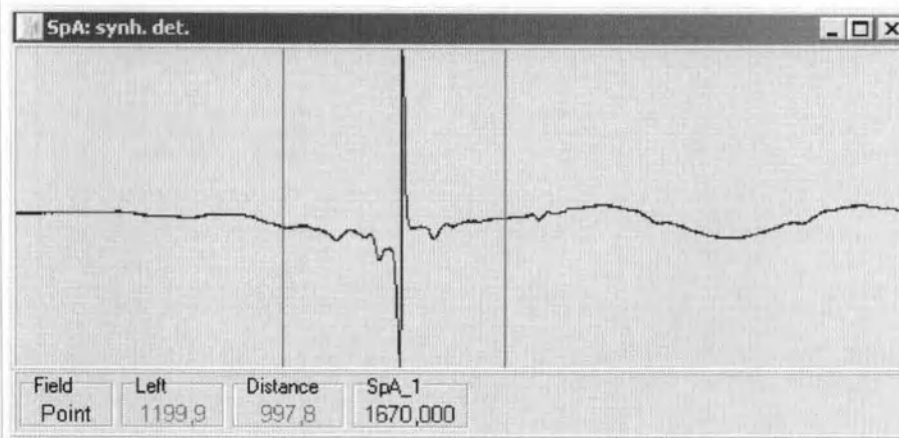
Middle of range	H ₀ -45
Scan range	30
Modulation	0,7
Time, s	30
Number	1
Attenuation, dB	10
Gain	100
Phase	0
Time constant, s	0,1

15. Нажать кнопку „Scan“. Выждать завершения регистрации спектра.
16. Открыть пункт меню „Spectra / Processing / Line“, в информационном окне „Line parameters“ прочитать величину, обозначенную „Amplitude“. Записать пару величин: „Amplitude“ и „Attenuation“ (см. пункт 14).
17. Повторить пункты 14–16 со значениями ослабления 11, 12, ..., 19, 20 dB.
18. Среди записанных данных найти пару с максимальной амплитудой линии. Обозначить величину ослабления в этой паре как P_{MAX}.
19. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / MW“, в окне редактирования „Attenuation at max. Mn²⁺ signal“ ввести число P_{MAX}.
20. Нажать кнопку „To device“.

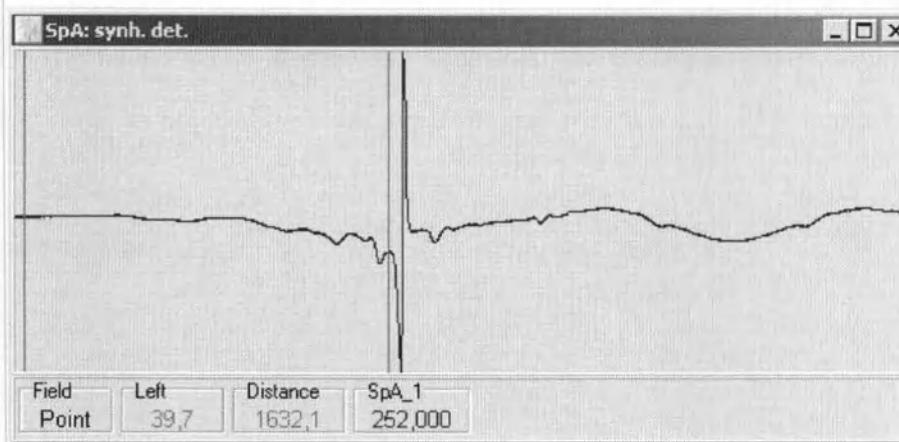
Определение параметров согласования СВЧ тракта

1. Включить Анализатор.
2. Запустить программу MMSCLIENT в режиме Extended.
3. Выждать 1 час.
4. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Parameters“ и нажать кнопку „Start“.
5. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Control“, в окне редактирования „Number of steps“ ввести 2000. В рамке „Drivers“ нажать кнопку с красной стрелкой слева от надписи „Gener“.
6. Нажать кнопки „AFC – On“, „Homodyne – On“. Надписи на кнопках должны измениться на „AFC – Off“, „Homodyne – Off“.
7. Отметить опцию „Write to RAM“, в поле редактирования „Number of steps“ ввести 4000, в поле редактирования „Step length“ ввести 1, в поле редактирования „ADC assum“ ввести 16. В рамке „Drivers“ нажать кнопку с красной стрелкой справа от надписи „Gener“ и выждать завершения измерений.
8. Нажать кнопку „View“ и выждать завершения передачи данных.
9. Наполнить стеклянный капилляр водой, вставить капилляр в тест-систему типа TS1-xx, поместить тест-систему с капилляром в Анализатор.
10. В рамке „Drivers“ нажать кнопку с красной стрелкой слева от надписи „Gener“.
11. Нажать кнопку „View“ и выждать завершения передачи данных.
12. Вынуть тест-систему с капилляром из Анализатора.
13. Закрыть окно меню „ESR analyser / Settings / Control“.
14. Открыть пункт меню „Spectra / Delete...“, выбрать „SpA_2“, нажать „Ok“.
15. Повторить пункт 14 со спектрами SpA_3, SpB_2 и SpB_3.

16. Сделать активным окно спектра SpA (кликом мышью на нем). Открыть пункт меню „Spectra / Window settings...“. Отметить опции „Markers“, „Field info“ и „Amplitude“. Снять отметки на опциях „Line centre“, „Line width“ и „Value“.
17. Разместить маркеры вокруг узкой биполярной линии в центральной части окна. Записать амплитуду линии (число в рамке „SpA_1“) как AL. В примере, приведенном ниже, $AL = 1670$.

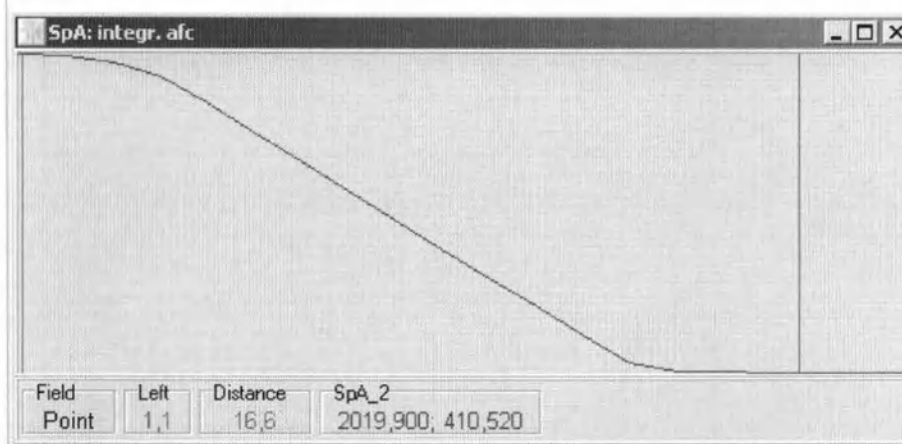


18. Поместить левый маркер у левой границы окна, правый маркер – слева от узкой биполярной линии. Записать амплитуду базовой линии (число в рамке „SpA_1“) как AB1. В примере, приведенном ниже, $AB1 = 252$.

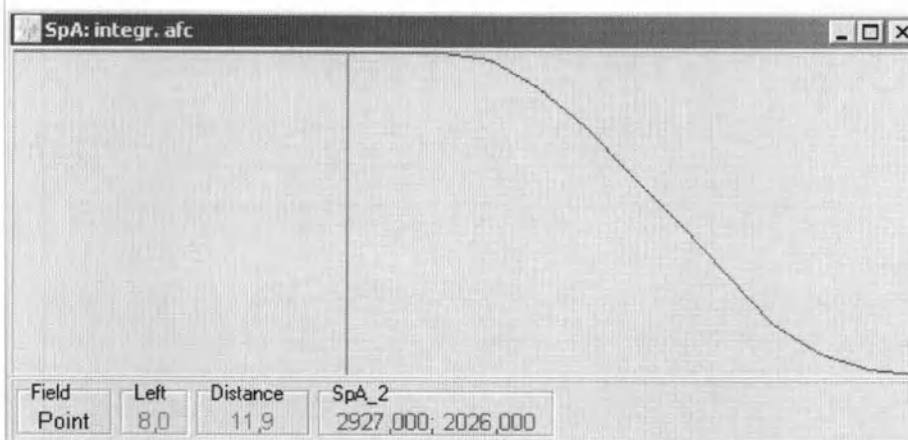


19. Поместить левый маркер справа от узкой биполярной линии, правый маркер – у правой границы окна. Записать амплитуду базовой линии (число в рамке „SpA_1“) как AB2.
20. Повторить пункты 16 – 19 с окном спектра SpB.
21. Выбрать меньшую из двух величин AL, выбрать большую из четырех величин AB. Рассчитать PF как среднее выбранных AB и AL. Рассчитанное значение PF можно округлить до десятков или до сотен.
22. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Adjustment“, ввести число PF в два окна редактирования, находящиеся в колонке „Criteria“ и в рядах „Frequency“ и „Generator“.
23. Нажать кнопку „To device“.
24. Закрыть окна спектров SpA и SpB.
25. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Parameters“ и нажать кнопку „Start“.

26. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Control“, отметить опцию „Write to RAM“, в поле редактирования „Number of steps“ ввести 20, в поле редактирования „Step length“ ввести 1, в поле редактирования „ADC accum“ ввести 16. В рамке „Drivers“ нажать кнопку с красной стрелкой справа от надписи „Gener“.
27. Нажать кнопку „View“.
28. Открыть пункт меню „Spectra / Delete...“, выбрать „SpA_1“, нажать „Ok“.
29. Повторить пункт 28 со спектром SpA_3.
30. Открыть пункт меню „Spectra / Window settings...“. Отметить опции „Markers“, „Field info“ и „Value“.
31. Поместить левый маркер у левой границы окна, правый маркер – на правую полку зарегистрированного сигнала.



32. Рассчитать $B1 = VL - 0,75 \times (VL - VR)$, где VL и VR – левое и правое числа в рамке SpA_2. Рассчитанное значение B1 можно округлить до десятков или до сотен.
33. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Adjustment“, ввести число B1 в левое поле редактирования, обозначенное „Possible“, находящееся в рамке „Integrator level bounds“.
34. Нажать кнопку „To device“.
35. Закрыть окна спектра SpA.
36. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Parameters“ и нажать кнопку „Start“.
37. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Control“. В рамке „Drivers“ нажать кнопку с красной стрелкой слева от надписи „Gener“.
38. Нажать кнопку „View“.
39. Открыть пункт меню „Spectra / Delete...“, выбрать „SpA_1“, нажать „Ok“.
40. Повторить пункт 39 со спектром SpA_3.
41. Открыть пункт меню „Spectra / Window settings...“. Отметить опции „Markers“, „Field info“ и „Value“.
42. Поместить левый маркер на левую полку зарегистрированного сигнала, правый маркер – у правой границы окна.



43. Рассчитать $B2 = VR + 0,75 \times (VL - VR)$, где VL и VR – левое и правое числа в рамке SpA_2. Рассчитанное значение B2 можно округлить до десятков или до сотен.
44. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Adjustment“, ввести число B2 в правое поле редактирования, обозначенное „Possible“, находящееся в рамке „Integrator level bounds“.
45. Нажать кнопку „To device“.

Калибровка системы термостатирования образца

1. Включить Анализатор.
2. Запустить программу MMSCLIENT в режиме Extended.
3. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Temperature“, в поле редактирования в рамке „Stabilization“ ввести 37 и нажать кнопку „Set“.
4. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Termostabilization“, в оба поля редактирования в рамке „Air temperature definition“ ввести 0 и нажать „To device“.
5. Вставить термодатчик термометра „Checktemp-1“ в держатель ампулы. Поместить держатель ампулы с термодатчиком в Анализатор.
6. Выждать 2 часа.
7. Включить термометр „Checktemp-1“.
8. Открыть пункт меню „ESR analyser / Settings / Temperature“. Записать температуру резонатора (обозначенную „Res“) из рамки „Measure“ как TR1. Ввести число TR1 в окно редактирования в рамке „Stabilization“ и нажать кнопку „Set“.
9. Выждать 5 минут.
10. Записать температуру потока воздуха (обозначенную „Air“) из рамки „Measure“ как TA1 и температуру образца с индикатора „Checktemp-1“ как TS1.
11. Рассчитать разность $D = TA1 - TS1$.
12. В поле редактирования в рамке „Stabilization“ ввести 45 и нажать кнопку „Set“.
13. Выждать 10 минут.
14. Записать температуру резонатора (обозначенную „Res“) из рамки „Measure“ как TR2, температуру потока воздуха (обозначенную „Air“) как TA2 и температуру образца с индикатора „Checktemp-1“ как TS2.
15. Рассчитать коэффициент $F = (TA2 - TS2 - D) / (TS2 - TR2)$.
16. Открыть пункт меню „ESR analyser / Calibration / Termostabilization“, ввести значение разности D в правое поле редактирования в рамке „Air temperature definition“, ввести коэффициент F в левое поле редактирования в этой же рамке и нажать кнопку „To device“.
17. Вынуть держатель ампулы с термодатчиком из Анализатора. Выключить термометр „Checktemp-1“.

Nr. der Eintragung	a) Firma b) Sitz, Niederlassung, Zweigniederlassungen c) Gegenstand des Unternehmens	Grund- oder Stammkapital	a) Allgemeine Vertretungsregelung b) Vorstand, Leitungsorgan, geschäftsführende Direktoren, persönlich haftende Gesellschafter, Geschäftsführer, Vertretungsberechtigte und besondere Vertretungsbefugnis	Prokura	a) Rechtsform, Beginn, Satzung oder Gesellschaftsvertrag b) Sonstige Rechtsverhältnisse	a) Tag der Eintragung b) Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
1	a) MedInnovation GmbH b) Berlin c) Entwicklung, Produktion und Vermarktung medizin- und biotechnologischer Erzeugnisse und Dienstleistungen von Labortechnik und Ausrüstung, Geräte und Anlagen des wissenschaftlichen Gerätebaus, weiterhin der Groß- und Einzelhandel mit medizin- und biotechnologischen Erzeugnissen bzw. Erzeugnissen mit Relevanz zur Medizin und biotechnologischen Objekten, darunter auch Laborausrüstungen, Labortechnik, Labor- und Verbrauchsmaterialien sowie von Geräten und Anlagen des wissenschaftlichen Gerätebaus, weiterhin Beratung von Unternehmen bei der Einführung und Realisierung von Medizin- und Biotechnologien, die betriebswirtschaftliche Beratung sowie die Beteiligung an der Realisierung und Finanzierung solcher Technologien.	50.000 DM	a) Ist ein Geschäftsführer bestellt, so vertritt er die Gesellschaft allein. Sind mehrere Geschäftsführer bestellt, wird die Gesellschaft gemeinschaftlich durch zwei Geschäftsführer oder durch einen Geschäftsführer in Gemeinschaft mit einem Prokuristen vertreten. Einzelvertretungsbefugnis kann erteilt werden. b) Geschäftsführer: 1. Seibt, Günter Gerald, *05.01.1956, Eichwalde mit der Befugnis die Gesellschaft allein zu vertreten mit der Befugnis Rechtsgeschäfte mit sich selbst oder als Vertreter Dritter abzuschließen		a) Gesellschaft mit beschränkter Haftung Gesellschaftsvertrag vom: 27.04.1995 mit letzter Änderung vom 22.05.2000	a) 02.08.2004 Bierkandt b) Tag der ersten Eintragung 25.06.1996 Dieses Blatt ist zur Fortführung auf EDV umgeschrieben worden und dabei an die Stelle des bisherigen Registerblattes getreten.

Nr. der Eintragung	a) Firma b) Sitz, Niederlassung, Zweigniederlassungen c) Gegenstand des Unternehmens	Grund- oder Stammkapital	a) Allgemeine Vertretungsregelung b) Vorstand, Leitungsorgan, geschäftsführende Direktoren, persönlich haftende Gesellschafter, Geschäftsführer, Vertretungsberechtigte und besondere Vertretungsbefugnis	Prokura	a) Rechtsform, Beginn, Satzung oder Gesellschaftsvertrag b) Sonstige Rechtsverhältnisse	a) Tag der Eintragung b) Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
	Unternehmenszweck ist auch die Übernahme der Geschäftsführung bei gleichen oder ähnlichen Unternehmen sowie an Beteiligungen an Unternehmen gleicher oder ähnlicher Art.					
2		35.000 EUR			a) Durch Beschluss der Gesellschafterversammlung vom 19.07.2004 ist das Stammkapital auf EUR umgestellt, auf insgesamt 35.000 EUR erhöht und der Gesellschaftsvertrag geändert in § 3 (Stammkapital).	a) 07.12.2004 Zenke b) Beschluss Bl. 56
3		50.000 EUR			a) Durch Beschluss der Gesellschafterversammlung vom 07.12.2006 ist das Stammkapital um 15.000 Euro auf 50.000 Euro erhöht und der Gesellschaftsvertrag geändert in § 3 (stammkapital) und § 6 (Gesellschafterversammlungen).	a) 02.02.2007 Zenke

Amtsgericht Charlottenburg, 09.03.2007 11:04 Uhr

Nummer der Eintragung	a) Firma b) Sitz, Niederlassung, Zweigniederlassungen c) Gegenstand des Unternehmens	Grund- oder Stammkapital	a) Allgemeine Vertretungs- regelung b) Vorstand, Leitungsorgan, ge- schäftsführende Direktoren, persönlich haftende Gesell- schafter, Geschäftsführer, Vertretungsberechtigte und besondere Vertretungsbefugnis	Prokura	a) Rechtsform, Beginn, Satzung oder Gesellschaftsvertrag b) Sonstige Rechtsverhältnisse	a) Tag der Ein- tragung b) Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7

Dieser Ausdruck bezeugt den aktuellen Inhalt des Handelsregisters B

Der Ausdruck ~~wird nicht unterschrieben und~~ gilt als beglaubigte Abschrift

Domay, Justizangestellte
Urku ndsbeamtin der Geschäftsstelle



номер записи	а) фирма; б) местонахождение, филиал, отделения; в) предмет деятельности предприятия.	Основной или уставный капитал	а) общие вопросы представительства б) Совет директоров, правление, управляющие директора, компаньон, несущий ответственность за долги общества всем своим имуществом, член правления, уполномоченные на представительство и особые полномочия на представительство.	общая торговая доверенность (прокура)	а) правовая форма, начало и местонахождение; б) прочие правовые отношения;	а) дата записи; б) примечания.
1	2	3	4	5	6	7
1	а) МедИнновэйшэн ГмбХ б) Берлин в) Разработка, производство и сбыт медицинских и биотехнологических продуктов и услуг лабораторной техники и оснащения, приборов и оборудования научного приборостроения, а также оптовая и розничная торговля медицинскими и биотехнологическими продуктами или продуктами, имеющими отношение к медицине и биотехнологическим объектам, в том числе оснащением для лабораторий, лабораторная техника, лабораторными и расходными материалами, а также приборами и оборудованием научного приборостроения, кроме того, консультирование предпринимателей в продвижении и реализации медицинских и биотехнологий, консультирование по организации производства, а также участие в реализации и финансировании таких технологий.	<u>50.000 DM.</u>	а) Если назначен один управляющий, то он представляет общество единолично. При назначении нескольких управляющих общество представляют совместно два управляющих или один управляющий совместно с доверенным лицом. Право на единоличное представительство может быть передано. б) управляющий: 1. Зайбт, Гюнтер Геральд * 05.01.1956г., Айхвальде С правом на единоличное представительство общества С правом единолично заключать правовые сделки или в качестве представителя третьих лиц.		а) Общество с ограниченной ответственностью Учредительный договор от: 27.04.2000 г. с последним изменением от 22.05.2000 г.	а) 02.08.2004 г. Биркандт б) Дата первой записи: 25.06.1996 г. Данная запись для ее дальнейшего ведения была перезаписана с применением средств электронной обработки данных и заступила, тем самым, на место прежней регистрационной записи.

номер записи	а) фирма; б) местонахождение, филиал, отделения; в) предмет деятельности предприятия.	Основной или уставный капитал	а) общие вопросы представительства б) Совет директоров, правление, управляющие директора, компаньон, несущий ответственность за долги общества всем своим имуществом, член правления, уполномоченные на представительство и особые полномочия на представительство.	общая торговая доверенность (прокура)	а) правовая форма, начало и местонахождение; б) прочие правовые отношения;	а) дата записи; б) примечания.
1	2	3	4	5	6	7
1	Целью предприятия является также передача руководство предприятием в случае одинаковой или похожей предпринимательской деятельности, а также участие в предприятиях с одинаковой или похожей предпринимательской деятельностью					
2		35.000 EUR			а) решением Общего собрания акционеров от 19.07.2004 г. уставный капитал переведен в EUR и составил 35.000 EUR, внесены изменения в учредительный договор в § 3 (Уставный капитал)	а) 07.12.2004 г. Ценке б) Решение лист 56
3		50.000 EUR			а) Решением Общего собрания акционеров от 07.12.2006 г. уставный капитал увеличился на 15 000 EUR и составил 50 000 EUR, внесены изменения в учредительный договор в § 3 (Уставный капитал) и § 6 (Общее собрание акционеров)	а) 02.02.2007 г. Ценке

номер записи	а) фирма; б) местонахождение, филиал, отделения; с) предмет деятельности предприятия.	Основной или уставный капитал	а) общие вопросы представительства б) Совет директоров, правление, управляющие директора, компаньон, несущий ответственность за долги общества всем своим имуществом, член правления, уполномоченные на представительство и особые полномочия на представительство.	общая торговая доверенность (прокура)	а) правовая форма, начало и местонахождение; б) прочие правовые отношения;	а) дата записи; б) примечания.
1	2		3	4	5	6

Настоящая распечатка удостоверяет текущее содержание торгового реестра А.

Распечатка является заверенной копией.

**Домэй, должностное лицо канцелярии
судебного ведомства**

Круглая печать:
СУД ПЕРВОЙ ИНСТАНЦИИ ШАРЛОТТЕНБУРГ
БЕРЛИН 204

АПОСТИЛЬ

(Гаагская конвенция от 5 октября 1961 года)

1. Страна: Федеративная Республика Германия
2. Настоящий официальный документ подписан
должностным лицом канцелярии судебного ведомства
Домэй
3. Выступающим в качестве должностного лица, уполномоченного выполнять
засвидетельствование документов
4. С приложением печати/штампа
Суда первой инстанции Шарлоттенбурга
- Удостоверено**
5. в 14057 Берлине 6. 09.03.2007 г.
7. Президентом Суда первой инстанции Шарлоттенбурга
в Берлине
8. под номером **910 E-A 116/07**
9. Печать/штамп:
Президент Суда первой инстанции
Шарлоттенбурга
Берлин
10. Подпись:
по уполномочию
Подпись
Вольфайль

Перевод документа с немецкого языка на русский язык
выполнен мною, **Лысенко Мариной Германовной**.

Лысенко Марина Германовна *М-*

Город Москва, Россия.

Двадцать третье мая две тысячи седьмого года. (23.05.2007).
Я, Олефиренко Елена Викторовна, нотариус города Москвы,
свидетельствую подлинность подписи сделанной переводчиком Лысенко
Мариной Германовной в моем присутствии. Личность
ее установлена.

Зарегистрировано в реестре за № 11-462
Взыскан тариф в сумме 300 рублей

прошито, пронумеровано
и скреплено печатью

восемь (8) лист 06

Нотариус

