



(10) **DE 10 2013 212 539 B4** 2015.07.23

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2013 212 539.9**
(22) Anmeldetag: **27.06.2013**
(43) Offenlegungstag: **15.01.2015**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **23.07.2015**

(51) Int Cl.: **G01N 15/02 (2006.01)**

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, 26129
Oldenburg, DE**

(74) Vertreter:
Taruttis, Stefan, Dr., 30159 Hannover, DE

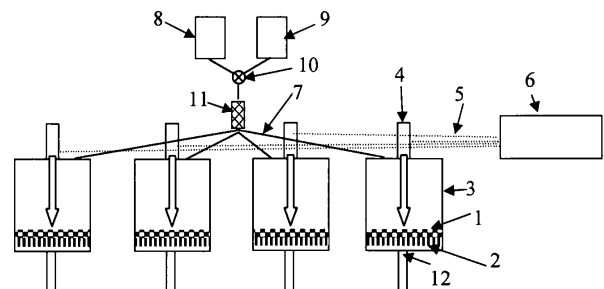
(72) Erfinder:
**Rößner, Frank, Prof. Dr., 26131 Oldenburg, DE;
Rudakova, Lyudmila, Dr., Woronesch, RU**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

GB	2 426 333	A
US	8 420 025	B2
US	2003 / 0 027 240	A1
US	2008 / 0 216 563	A1
US	5 369 037	A
US	5 611 998	A
WO	01/ 16 575	A1
JP	H01- 274 037	A

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Analyse**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Messung der Konzentration zumindest eines in einer ersten flüssigen Phase in einer ersten Konzentration enthaltenen Analyten mit den Schritten
– Bereitstellen von zumindest zwei, jeweils mit einem Einlass und einem Auslass versehenen Kammern, in denen jeweils Partikel einer unterschiedlichen Art von vernetztem Polymer enthalten sind,
– Zuführen einer zweiten flüssigen Phase, die eine vorbestimmte zweite Konzentration des Analyten enthält, in jede Kammer,
– Zuführen der ersten flüssigen Phase in jede Kammer,
– Bestimmen der Abmessungen zumindest eines Partikels in jeder Kammer und Berechnen der relativen Änderung der Abmessungen zumindest eines Partikels für jede Art von Polymer bei Zuführen der ersten flüssigen Phase und bei Zuführen der zweiten flüssigen Phase,
– Korrelieren der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderungen der Abmessungen für jede Art von Polymer zur Konzentration des Analyten und
– Anzeigen der ersten Konzentration des Analyten, die sich aus dem Korrelieren ergibt.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Messung der Konzentration eines Analyten, der in einer flüssigen Phase enthalten ist.

[0002] Das Verfahren erlaubt eine Bestimmung der Konzentration des Analyten in der flüssigen Phase und aufgrund der Spezifität des Verfahrens für Analyten bevorzugt eine qualitative und quantitative Bestimmung von zumindest einem Analyten, der in der flüssigen Phase enthalten ist, insbesondere darin gelöst ist.

Stand der Technik

[0003] Es ist generell bekannt, dass Harze aus Polymeren, beispielsweise Ionenaustauscherharze, in flüssigen Phasen quellen. Es ist bekannt, dass Analyten in einer Packung aus Harzpartikeln bei Durchströmen mit einer flüssigen Phase eine für den Analyten spezifische Retentionszeit aufweisen, die in der Säulenchromatographie genutzt wird.

[0004] Die US 2003/0027240 A1 beschreibt einen Sensor für Glucose, bei dem eine Reihe kubischer Kolloidpartikel in Polyacrylamid-Hydrogel eingebettet ist und sich in Gegenwart eines glucosebindenden Reagenzes, z. B. Borsäurederivaten, in Abhängigkeit von Glucose das Volumen des Hydrogels und damit dessen optische Brechungseigenschaften ändert.

[0005] Die US 8,420,025 B2 beschreibt ein Analysesystem, das eine Vielzahl von Kammern aufweist, in denen jeweils ein optischer Sensorfilm angeordnet ist, wobei die Kammern durch Mikrofluidikkammern mit einer Probenaufgabe verbunden sind. Die Reaktionen der jeweiligen Sensorfilme auf die Probe werden optisch aufgenommen.

[0006] Die US 5,611,998 A beschreibt einen Sensor, bei dem auf einer Spiegelschicht eine vom Analyten abhängig quellfähige Schicht liegt, die von einer Schicht abgedeckt wird, in der leitfähige Partikel beabstandet angeordnet sind, die kleiner als die Wellenlänge des eingestrahlten und gemessenen Lichts sind. Unterschiede in der Quellung können als Änderung der optischen Dicke zwischen der Spiegelschicht und der Schicht mit leitfähigen Partikeln bestimmt werden.

[0007] Die GB 2426333 A beschreibt die Messung der Biegung eines Streifens aus quellfähigem Polymer, der optional auf einem nicht quellfähigen Polymer aufliegt, zur Konzentrationsmessung eines Analyten in Lösung.

[0008] Die WO 01/16575 A1 beschreibt einen Glucosesensor aus einem Hydrogel, in dem Concanavalin A und ein Hexosesaccharid gebunden sind, so dass sie einen Komplex bilden können und in Anwesenheit freier Glucose das gebundene Hexosesaccharid aus dem Komplex verdrängt wird und sich das Volumen des Hydrogels ändert. Diese Volumenänderung kann als Druckänderung gemessen werden.

[0009] Die Zusammenfassung der JP 000H01274037 A beschreibt das Messen einer Salzkonzentration durch Bestimmung der Volumenabnahme eines in reinem Wasser vorgequollenen Polymers.

[0010] Die US 2008/0216563 A1 beschreibt eine Vorrichtung zur Analyse einer Polymerisationsreaktion, mit der zwei Ströme daraus entnommen werden und jeder Strom verdünnt wird, um Polymere bzw. lösliche Bestandteile zu bestimmen.

[0011] Die US 5,369,037 A beschreibt die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyten mit Partikeln, die für jeden Analyt eine unterschiedliche Größe haben und ein Bindemolekül aufweisen, so dass für jeden Analyt eine spezifische Lichtstreuung aggregierter Partikel gemessen werden kann.

Aufgabe der Erfindung

[0012] Die Aufgabe der Erfindung liegt darin, ein einfaches Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens bereitzustellen, mit denen in einer flüssigen Phase enthaltene Analyten qualitativ und quantitativ bestimmt werden können.

Allgemeine Beschreibung der Erfindung

[0013] Die Erfindung löst die Aufgabe mit den Merkmalen der Ansprüche 1 bzw. 18. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Messung der Konzentration eines Analyten, der in einer ersten Konzentration in einer ersten flüssigen Phase enthalten ist, umfasst die Schritte des Bereitstellens von zumindest zwei Kammern, die jeweils mit einem Einlass und einem Auslass für eine flüssige Phase versehen sind, und die jeweils Partikel einer Art von Polymer, das optional vernetzt ist und/oder funktionelle Gruppen aufweist, enthalten, wobei jede Kammer Partikel aus einer unterschiedlichen Art von Polymer enthält. Das Verfahren beruht darauf, dass eine Änderung der Abmessungen von Partikeln bei Kontakt mit der den Analyten enthaltenden flüssigen Phase von der chemischen Phase des Polymers bzw. dessen Struktureinheiten, dessen Vernetzungsgrad sowie funktionellen Gruppen abhängig ist. Es hat sich gezeigt, dass die Änderung der Abmessung, vorliegend auch als Quellverhalten bezeichnet, für verschiedene Polymere unterschiedlich ist, wenn jeweils dieselbe flüssige Phase mit derselben Analyten in derselben Konzentration vorliegen bzw. der Kammer zugeführt werden und/oder die Kammer durchströmen. Entsprechend ändert sich das Quellverhalten eines Polymers sowohl mit der Art des Analyten, als auch mit der Konzentration des Analyten in der flüssigen Phase und mit der Art der Flüssigkeit, die zusätzlich zum Analyten die flüssige Phase bildet, z. B. Wasser, organisches Lösungsmittel oder ein Gemisch dieser. Das Bereitstellen von Partikeln jeweils unterschiedlicher Arten von Harz in getrennten Kammern führt beim Durchströmen der Kammern mit der ersten flüssigen Phase bevorzugt für jede Art von Polymer zu einem unterschiedlichen Quellverhalten des Partikels. Das Bereitstellen von zumindest zwei, vorzugsweise drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn oder mehr Kammern, die jeweils Partikel einer unterschiedlichen Art Polymer enthalten, führt beim Durchströmen der Kammern mit der ersten flüssigen Phase in Abhängigkeit von der Art von Polymer zu unterschiedlichem Quellverhalten der Partikel. Die Partikel bestehen aus in der flüssigen Phase, bzw. dem Medium, das die flüssige Phase bildet, unlöslichem und quellfähigem Polymer, das vernetzt ist.

[0014] Erfindungsgemäß bevorzugt wird der pH-Wert der ersten flüssigen Phase eingestellt, bevorzugt zuvor gemessen, da sich gezeigt hat, dass die relative Änderung der Abmessungen der Partikel signifikant von der Ionisierung des Analyten abhängt, insbesondere, wenn das Polymer, aus dem die Partikel bestehen, ionisierbare Gruppen aufweist. Erfindungsgemäß wird daher der pH-Wert der flüssigen Phasen, für die die relative Größenänderung der Partikel bestimmt wird, auf denselben Wert eingestellt, optional wird die relative Größenänderung bei zumindest zwei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Entsprechend sind als Analyten solche bevorzugt, die zumindest eine ionisierbare Gruppe aufweisen, z. B. zumindest eine Säuregruppe, Hydroxylgruppe, Aminogruppe, eine aromatische Gruppe, insbesondere eine Phenylgruppe. Die flüssige Phase kann auch als Medium bezeichnet werden, in dem der Analyt gelöst ist.

[0015] Der pH-Wert kann auf einen pH-Wert gleich dem isoelektrischen Punkt des Analyten eingestellt werden, bevorzugt auf einen pH-Wert größer als oder kleiner als der pH-Wert des isoelektrischen Punkts des Analyten. In einer Ausführungsform kann der pH-Wert der ersten flüssigen Phase unabhängig vom Analyten auf einen vorbestimmten Wert eingestellt werden, bei dem ionisierbare Gruppen ionisiert sind.

[0016] Der pH-Wert kann in herkömmlicher Weise eingestellt werden, z. B. durch Zugabe von Säure, Lauge bzw. Puffersubstanz.

[0017] Das Verfahren sieht vor, die durch das Quellverhalten bewirkte Änderung der Abmessungen der Partikel für die erste flüssige Phase relativ zu dem Quellverhalten bzw. relativ zu den Abmessungen derselben Partikel in einer zweiten flüssigen Phase zu bestimmen, wobei die zweite flüssige Phase eine zweite Konzentration des Analyten aufweist, die bekannt ist, z. B. null oder eine andere vorbekannte Konzentration. Die relative Änderung der Abmessungen der Partikel, auch als relative Größenänderung oder Quellverhalten bezeichnet, umfasst auch eine Verkleinerung bzw. Schrumpfung.

[0018] Alternativ kann die zweite Konzentration durch Zusetzen von Analyt zu der ersten flüssigen Phase erzeugt sein, oder durch Verdünnen durch Zusatz der Flüssigkeit, die die flüssige Phase ausmacht, ohne den Analyten. Dabei ergibt sich die zweite Konzentration der zweiten flüssigen Phase durch die Zugabe einer vorbekannten Menge des Analyten zu der ersten flüssigen Phase bzw. durch Verdünnung der ersten flüssigen Phase durch Zusatz der Flüssigkeit, die die erste flüssige Phase bildet, ohne Analyten. Bei Zusetzen von Analyt zu der ersten flüssigen Phase zur Herstellung der zweiten flüssigen Phase ist bevorzugt, dass der Analyt in Lösung in einem Medium der ersten flüssigen Phase zugesetzt wird, das denselben pH-Wert aufweist, oder das den pH-Wert der ersten flüssigen Phase nicht wesentlich ändert, z. B. ein Medium, das im Wesentlichen keine Pufferkapazität hat. In Ausführungsformen, bei denen Analyt der ersten flüssigen Phase in vorbestimmter Menge zugegeben wird ist daher bevorzugt, dass der Analyt in einem geringen Volumen bzw. in hoher

Konzentration, vorzugsweise in wässriger Lösung, zugemischt wird. In Ausführungsformen, bei denen die erste flüssige Phase verdünnt wird, um die zweite flüssige Phase zu bilden, wird zur Verdünnung vorzugsweise Wasser zugesetzt, das optional denselben Gehalt an Salz und Lösungsmittel ausgenommen den Analyten aufweisen kann, wie die erste flüssige Phase.

[0019] Bevorzugt ist die erste und/oder die zweite flüssige Phase wässrig, optional mit einem Gehalt an organischem Lösungsmittel.

[0020] Bevorzugt ist der Analyt wasserlöslich und weist auf oder besteht aus einer oder mehreren miteinander verbundenen Aminosäuren, anorganischem Salz, organischem Lösungsmittel, insbesondere Methanol, Ethanol oder einem C3- bis C8-Alkohol, C5- bis C20- gesättigtem oder ungesättigtem Kohlenwasserstoff, pharmazeutischem Wirkstoff, wobei der Analyt bevorzugt zumindest eine ionisierbare Gruppe aufweist.

[0021] Optional kann das Verfahren zusätzlich durchlaufen werden, wobei der pH-Wert der ersten und der zweiten flüssigen Phase auf einen zweiten pH-Wert eingestellt wird. Dabei kann der zweite pH-Wert um z. B. 1 bis 3 pH-Einheiten höher oder niedriger liegen als der zuvor eingestellte pH-Wert, wobei insbesondere der pH-Wert höher oder niedriger als der des isoelektrischen Punkts des Analyten liegen kann. Bei dieser Ausführungsform wird entsprechend des voranstehend beschriebenen Verfahrens jede dieser flüssigen Phasen jeder Kammer zugeführt und die Abmessungen der Partikel, die relative Änderung der Abmessungen zumindest eines Partikels für jede Art von Polymer werden bestimmt und die relative Änderung der Abmessungen für jede Art von Harz wird mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderungen der Abmessungen dieser Art von Polymer zur Konzentration des Analyten korreliert und die erste Konzentration des Analyten, die sich aus dem Korrelieren ergibt, wird für jede Art von Polymer angezeigt. Diese Ausführungsform hat den Vorteil einer höheren Genauigkeit.

[0022] Die Bestimmung der Abmessungen zumindest eines Partikels aus jeder Kammer kann z. B. mit dem Schritt des Berechnens der relativen Änderung der Abmessungen zumindest eines Partikels jeder Art von Polymer erfolgen, die zwischen dem Durchströmen mit der Flüssigkeit, die die erste Konzentration enthält und Durchströmen mit derselben Flüssigkeit, die eine zweite Konzentration des Analyten enthält, bestimmt wird. Dabei ist die relative Änderung der Abmessungen die Änderung der Abmessungen in Bezug zu der Abmessung, die für den Partikel in Kontakt mit der ersten flüssigen Phase bestimmt wird, bevorzugt in Kontakt mit der zweiten flüssigen Phase. Z. B. kann die relative Änderung f als $f = (V - V_0)/V$ berechnet werden, wobei V_0 das Volumen in Kontakt mit der ersten flüssigen Phase ist und V das Volumen in Kontakt mit der zweiten flüssigen Phase. Für die Zwecke der Erfindung wird die relative Änderung der Abmessung in zumindest einer Dimension als relative Änderung der Abmessungen angesehen. Die Berechnung der relativen Änderung der Abmessungen für einen Partikel jeden Art von Polymer mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderung der Abmessung für diese Art von Polymer korreliert mit der Konzentration des Analyten in der flüssigen Phase, sodass aus der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer auf die Konzentration des Analyten geschlossen werden kann.

[0023] Das Anzeigen der Konzentration des Analyten kann mittels einer graphischen Darstellung erfolgen, bei der für jede in einer Kammer enthaltene Art von Polymer ein Wert angezeigt wird. Eine solche graphische Zuordnung eines Wertes, der mittels eines vorbestimmten Verhältnisses der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer für den Analyten in der flüssigen Phase bestimmt ist, bietet z. B. ein übersichtliches visuelles Anzeigen, das einen eindeutigen graphischen Mustervergleich zulässt. Dieser graphische Mustervergleich entspricht einer parallelen Darstellung der Konzentration des Analyten, die mit jeder Art von Polymer bestimmt wurde, wobei deren qualitative und quantitative Genauigkeit mit zunehmender Anzahl von Kammern, die jeweils Partikel einer anderen Art von Polymer enthalten, zunimmt. Das visuelle Anzeigen kann in Form eines Netzdiagramms erfolgen, bei dem für jede Art von Polymer die relative Größenänderung dargestellt wird. Optional kann der Schritt des Korrelierens der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Harz mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderungen der Abmessungen für jede Art von Polymer zur Konzentration des Analyten durch Vergleich mit vorbestimmten Verhältnissen der Kombination der relativen Änderungen der Abmessungen für jede Art von Polymer erfolgen, die in einer Datenbank gespeichert sind. Das Anzeigen kann alternativ als Darstellung eines Werts für die Konzentration des Analyten erfolgen, wobei bevorzugt der Wert durch Korrelieren der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderungen der Abmessungen für diese Art von Harz zur Konzentration des Analyten in der Flüssigkeit bestimmt ist und für zumindest 2, bevorzugter 3, noch bevorzugter 4 oder 5 oder 6 oder 7 oder 8 oder 9, weiter bevorzugt für zumindest 10 Arten von Polymer bestimmt ist. Auf diese Weise trägt jede Art von Polymer zur Genauigkeit des Verfahrens bei.

[0024] Vorteilhafterweise weist das Verfahren das Bereitstellen einer Mehrzahl von Kammern mit jeweils einer Art Polymer auf, da mit steigender Anzahl eine größere Genauigkeit der Bestimmung bzw. des Anzeigens der Konzentration des Analyten erfolgt.

[0025] In einer ersten Ausführungsform erfolgt das Bestimmen der Abmessungen von Partikeln durch ein bildgebendes Verfahren, z. B. auf Basis von Bildern, die eine elektronische Kamera, insbesondere eine elektronische Kamera in Verbindung mit einem Mikroskop, von den in den Kammern enthaltenen einzelnen Partikeln aufgenommen hat. Das Aufnehmen der Bilder erfolgt während des Durchströmens der Kammer mit der den Analyten enthaltenen flüssigen Phase oder bei Unterbrechung des Durchströmens. Dabei kann die Kammer erst mit der flüssigen Phase durchströmt werden, die eine vorbestimmte zweite Konzentration des Analyten enthält und nachher mit der flüssigen Phase durchströmt wird, die die erste Konzentration des Analyten enthält, die mit dem Verfahren gemessen wird, oder das Durchströmen der Kammern mit den flüssigen Phasen erfolgt in umgekehrter Reihenfolge.

[0026] In Alternative zur optischen Bestimmung der Abmessungen eines Partikels aus jeder Kammer durch Aufnehmen von Bildern einzelner Partikel mittels einer elektronischen Kamera kann das Bestimmen der Abmessungen in einer zweiten Ausführungsform mittels Laserbeugung erfolgen, z. B. gemäß ISO 13320: 2009.

[0027] Für die optische Bestimmung der Abmessungen von Partikeln ist die Laserbeugung mittels nahen Infrarots (NIR) bevorzugt, insbesondere mittels eines Lichtleiters, dessen Austrittsquerschnitt in einem geringen Abstand oder angrenzend an Partikeln angeordnet ist.

[0028] In dieser Ausführungsform können die Partikel in einer Kammer in loser Schüttung angeordnet sein, die auf einer Seite von einem Gitter begrenzt wird und die von der anderen Seite mit der flüssigen Phase angeströmt wird.

[0029] Die Kammern können jeweils von einem Teilstrom der flüssigen Phasen durchströmt werden und z. B. parallel durchströmt werden, wobei beispielsweise die Einlässe der Kammern an einem gemeinsamen Verteiler angeschlossen sind. Alternativ können die Kammern nacheinander von den flüssigen Phasen durchströmt werden, wobei beispielsweise jeweils der Einlass einer Kammer mit dem Auslass einer anderen Kammer verbunden ist.

[0030] Für das reproduzierbare Aufnehmen von Bildern der in den Kammern enthaltenen einzelnen Partikel ist es bevorzugt, dass die Partikel Orts- und lagefest in den Kammern angeordnet sind, in dem sie z. B. auf beabstandeten Tragelementen angeordnet sind. Solche Tragelemente können z. B. beabstandete Vorsprünge sein, beispielsweise beabstandete Stangen, ein Siebträger oder ein Gitter, sodass die Partikel auf den Tragelementen aufliegen können. Solche beabstandeten Tragelemente erlauben eine spannungsfreie Anordnung der Partikel, sodass die Partikel unbelastet ihre Abmessungen abhängig von der flüssigen Phase und der Konzentration und Art des Analyten verändern können.

[0031] Bevorzugt sind die beabstandeten Tragelemente in einer gemeinsamen Ebene angeordnet oder enden in einer gemeinsamen Ebene, sodass Partikel in dieser Ebene in einer Schicht, d. h. vereinzelt angeordnet sind. Diese Schicht kann wahlweise durchgängig oder unterbrochen sein. Dabei ist die Ebene wahlweise eben oder gekrümmt.

[0032] Bevorzugt erstrecken sich die Tragelemente in eine Ebene, die in einem Winkel von etwa 30 bis 120°, bevorzugt 75 bis 105°, besonders bevorzugt etwa 90° zu der Richtung angeordnet ist, in der flüssigen Phase die Kammer durchströmt. In dieser Ausführungsform werden die Partikel einerseits von allen Seiten von flüssiger Phase umströmt und werden andererseits spannungsfrei, ortsfest und lagefest in der Kammer angeordnet, sodass das Bestimmen der Abmessungen einzelner Partikel während des Durchströmens erfolgen kann. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Partikel ein im Verhältnis zu ihrer Abmessung eine geringe Änderung der Abmessungen aufweisen, d. h. eine relativ geringe relative Änderung der Abmessungen und/oder bei Partikeln, die unregelmäßig geformt sind, insbesondere eine von einer Kugelform abweichende Form haben. Denn die ortsfeste und lagefeste Anordnung der Partikel erlaubt das Bestimmen der Abmessungen der Partikel, z. B. durch Aufnehmen von Bildern bzw. mittels Laserbeugung jeweils derselben Partikel während des Durchströmens der Kammer mit flüssiger Phase, die den Analyten in der ersten oder zweiten Konzentration enthält.

[0033] Weiter bevorzugt werden in der ersten Ausführungsform von einzelnen Partikeln jeweils zumindest zwei Bilder in beabstandeten Ebenen aufgenommen und/oder die Bilder einzelner Partikel zu jedem Zeitpunkt

aus zwei Perspektiven aufgenommen. Auf diese Weise können die Abmessungen von Partikeln mit größerer Genauigkeit bestimmt werden. Für das Aufnehmen von Bildern in beabstandeten Ebenen einzelner Partikel kann z. B. die Brennweite der Kammer auf jede der beabstandeten Ebenen eingestellt werden, oder es können zwei oder mehr Kameras verwendet werden, die jeweils ein Bild in einer der beabstandeten Ebenen eines einzelnen Partikels aufnehmen.

[0034] Es hat sich gezeigt, dass das Quellverhalten beispielsweise bei wasserlöslichen Analyten, die mit Wasser die flüssige Phase bilden, ein Gleichgewichtszustand nach 1 bis 5 min, z. B. nach 3 bis 4 min erreicht wird, wenn die Kammer zunächst mit Wasser ohne den Analyten umströmt wird. Daher kann in einer Ausführungsform die Bestimmung der Abmessungen unmittelbar nach Änderung der Konzentration oder Art des Analyten in der flüssigen Phase gemessen werden, bevorzugt quasi-kontinuierlich, z. B. in kurzen Abständen, wobei die Geschwindigkeit der relativen Änderung der Abmessungen einzelner Partikel bestimmt wird. Bei dieser Ausführungsform wird die Geschwindigkeit der relativen Änderung der Abmessungen mit vorbestimmten Geschwindigkeiten der relativen Abmessung derselben Partikel korreliert, die bei Änderung von Konzentrationen und/oder Art des Analyten in der flüssigen Phase vorbestimmt wurde.

[0035] Bevorzugt betrifft das Verfahren die Messung der Konzentration eines Analyten in Wasser als Flüssigkeit, beispielsweise von Aminosäuren, Gesamtprotein, Glykol, insbesondere Methanol und/oder Ethanol oder pharmazeutische Wirkstoffe.

[0036] Das Verfahren hat den Vorteil, dass zu seiner Durchführung kein spezifischer Detektor erforderlich ist, insbesondere zumindest eine digitale Kamera oder eine Messeinrichtung zur Laserbeugung, insbesondere im NIR, ausreicht.

[0037] Die Arten von Polymer, auch als Harz bezeichnet, können unterschiedliche Struktureinheiten aufweisen, z. B. Homopolymere oder Heteropolymere mit oder aus Struktureinheiten von Acrylsäure, Acrylamid, Vinylalkohol, Styrol und/oder Divinylbenzol und können z. B. ausgewählt sein aus Polyacrylamid, Polyvinylalkohol, Polyacrylat, Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisat, wobei der Vernetzungsgrad durch Zusatz eines bifunktionellen Vernetzungsmittels von z. B. Divinylbenzol, N,N'-Methylenbisacrylamid oder Epichlorhydrin eingestellt ist. Das Polymer kann nicht-ionisch sein, insbesondere keine geladenen Gruppen aufweisen, z. B. Hydroxylgruppen, Ethergruppen, Estergruppen, z. B. Phenolate oder Polyvinylalkohol. Die optional vorhandenen funktionellen Gruppen können z. B. ausgewählt sein unter Kationenauschergruppen, z. B. Carbonsäure-, Sulfo-, Sulfat-, Sulfongruppen, Hydroxylgruppen und Phosphorylgruppen und/oder Anionenauschergruppen, z. B. primäre, sekundäre, tertiäre oder quartäre Aminogruppen oder aromatische, Stickstoffatome enthaltende Gruppen.

[0038] Bevorzugte Arten von Polymer sind Kationenaustauscherharze, z. B. stark saure Kationenaustauscherharze mit $-SO_3H$ -Gruppen auf der Basis von Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisaten, die optional gelartig und/oder makroporös sind, schwach saure Kationenaustauscher mit Carboxyl- und Phenylgruppen und schwach saure makroporöse Kationenaustauscher auf der Basis von Polyacrylsäure, Anionenaustauscherharze, z. B. gelartiges stark basisches Anionenaustauscherharz mit tertiären Ammoniumgruppen auf der Basis von Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisaten, Anionenaustauscherharz mit mittlerer Basizität mit pyridinischen Gruppen, Polyacrylamid, das mit 3% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid vernetzt ist und $-CONH_2$ -Gruppen aufweist, Polyvinylalkohol, der z. B. mit 20% Epichlorhydrin vernetzt ist, dessen aktive Gruppen z. B. $>CH-OH$ sind, stark basisches Anionenaustauscherharz auf der Basis von Vinylpyridin, stark basischer Anionenaustauscher auf der Basis von Zellulose mit quartären Aminogruppen, makroporöser, schwach basischer Anionenaustauscher mit tertiären Aminogruppen auf der Basis von Polystyrol, sowie makroporöser, schwach basischer Anionenaustauscher auf der Basis von vernetzter Polyacrylsäure.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0039] Die Erfindung wird nun genauer durch Beispiele und mit Bezug auf Figuren beschrieben, die

[0040] in Fig. 1 schematisch eine Vorrichtung für das Verfahren,

[0041] in Fig. 2A) bis C) graphische Darstellungen zum Anzeigen des Ergebnisses zeigen und

[0042] in Fig. 3 die Abhängigkeit der relativen Größenänderung von Partikeln von der Konzentration eines Analyten.

[0043] Fig. 1 zeigt schematisch eine Vorrichtung zur Durchführung des Analyseverfahrens, bei der Partikel **1** aus Polymer auf einem Siebträger als Tragelement **2** innerhalb einer Kammer **3** angeordnet sind. Die Fig. 1 zeigt vier parallele Kammern **3**, die jeweils gleich eingerichtet sind. Jeder Kammer **3** ist ein optischer Detektor **4**, beispielsweise eine Kamera mit einem optischen Mikroskop zugeordnet, die mittels einer Datenleitung **5** mit einer Anzeigeeinheit **6** verbunden ist, die vorzugsweise zur Korrelation der gemessenen relativen Änderungen mit vorbestimmten Werten für die relativen Änderungen bei vorbekannten Konzentrationen desselben Analyten bei dem eingestellten pH-Wert eingerichtet ist. Die Kamera, bevorzugt mit einem Mikroskop, kann parallel zur Strömungsrichtung auf die Partikel **1** gerichtet sein, bevorzugt in einem Winkel von bis zu 90° zur Strömungsrichtung. Jede Kammer **3** weist einen Einlass für eine Zuführleitung **7** auf, die über Leitungen mit einer Zuführeinrichtung für die erste flüssige Phase **8** und einer Zuführeinrichtung für die zweite flüssige Phase **9** verbunden sind. Auf der der Zuführleitung **7** gegenüberliegenden Seite des Tragelements **2** ist ein Auslass **12** angeordnet. Die Zuführeinrichtungen für erste flüssige Phase **8** bzw. zweite flüssige Phase **9** können mittels eines Ventils **10** mit den Zuführleitungen **7** verbunden sein, das eingerichtet ist, eine Verbindung nur mit einer der Zuführeinrichtungen **8, 9** herzustellen, oder die Leitung für beide Zuführeinrichtungen **8, 9** gleichzeitig zu öffnen, wobei bevorzugt ist, dass ein Mischer **11** in der Leitung angeordnet ist, um erste und zweite flüssige Phase vor Eintritt in die Zuführleitung **7** zu mischen. Das Ventil **10** kann ein Dosierventil sein. Die Zuführeinrichtungen für erste flüssige Phase **8** bzw. zweite flüssige Phase **9** sind bevorzugt zur Einstellung des pH-Werts der darin enthaltenen flüssigen Phase eingerichtet, wobei die Zuführeinrichtungen bevorzugt zur Messung des pH-Werts eingerichtet sind und insbesondere zur Übermittlung des gemessenen pH-Werts an die Anzeigeeinheit **6**.

Beispiel 1: Analyse von Aminosäuren

[0044] In der beschriebenen Anlage wurde ein Tablett, bestehend aus acht Kammern verwendet. In jeweils einer Kammer war ein Partikel mit ca. 0,3–1,0 mm Durchmesser angeordnet. Die Partikel bestanden aus den folgenden Arten von Polymer (Nummerierung für Fig. 2):

- (1) makroporöses, schwach saures Kationenaustauscherharz mit Carboxyl- und Phenylgruppen in der H⁺-Form,
- (2) makroporöses, schwach saures Kationenaustauscherharz mit Carboxylgruppen auf der Basis von Polyacrylsäure der H⁺-Form und einem Vernetzungsgrad von 4%,
- (3) stark saures Kationenaustauscherharz auf der Basis von sulfoniertem Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisat in der H[±]-Form,
- (4) makroporöses, schwach saures Kationenaustauscherharz mit Carboxylgruppen auf der Basis von Polyakrylsäure der H⁺-Form und einem Vernetzungsgrad von 7%,
- (5) stark basisches Anionenaustauscherharz mit quartären Ammoniumgruppen in der Cl⁻-Form,
- (6) Copolymerisat von Vinylalkohol und 20% Epichlorhydrin,
- (7) ein Copolymerisat von Styrol und Divinylbenzol bzw.
- (8) ein Copolymerisat von Acrylamid und 3% N',N-Methylenbisacrylamid.

[0045] Zunächst wurden die Partikel in Wasser (Fließgeschwindigkeit: 5 mL/min) als zweiter flüssiger Phase, die keinen Analyt enthielt, äquilibriert und anschließend mit einer an einem Lichtmikroskop angeschlossenen Kamera fotografiert. Der Radius jedes Partikels wurde mittels eines bildgebenden Verfahrens bestimmt. Nach 10 min wurde als erste flüssige Phase eine Lösung jeweils einer Aminosäure (jeweils 20 g/L Glycin, β-Alanin oder Phenylalanin) in Wasser zugeführt. Der pH-Wert der ersten und zweiten Phasen wurde auf denselben Wert eingestellt. Nach Erreichen des stationären Zustands nach 1 bis 5 min wurde der Radius der Partikel erneut vermessen und dessen relative Änderung bestimmt. Die jeweiligen Werte sind in dem Netzdiagramm von Fig. 2 dargestellt, wobei die Art des Polymers durch die außen am Netz angeordnete Nummer, die voranstehend angegeben ist, bezeichnet ist und die Ziffern 0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 und 1,5, die an den radial angeordneten Achsen angegeben sind, die relative Größenänderung der Partikel angeben. Die errechneten relativen Änderungen der Abmessungen der Partikel, die auf den Achsen aufgetragen sind, sind zur besseren Erkennbarkeit miteinander verbunden und die umfasste Fläche ist ausgefüllt.

[0046] Die Darstellung der Ergebnisse zeigt, dass die jeweiligen Analyten mit den unterschiedlichen Arten von Polymer ein jeweils anderes Quellverhalten zeigen, das für die Kombination von Partikeln aus unterschiedlichen Arten von Harz stoffspezifisch für den Analyten in der flüssigen Phase ist.

Beispiel 2: Quantitative Analyse einer Aminosäure

[0047] In 4 Messkammern wurden jeweils ein Partikel eines stark sauren Kationenaustauscherharzes (H⁺-Form) als Polymer platziert und einem Wasserfluss als zweiter flüssiger Phase von 5 mL/min ausgesetzt. Nach

dem Erreichen des stationären Zustands des Quellverhaltens wurde deren Radius wie in Beispiel 1 optisch bestimmt. Anschließend wurde als erste flüssige Phase eine wässrige Lösung von Lysozym ($c = 5 \text{ g/L}$) durch die Kammern strömen gelassen. Nach der Bestimmung der relativen Größenänderung $((V - V_0)/V_0)$ wurde die Konzentration des Lysozyms schrittweise erhöht. **Fig. 3** zeigt die relative Größenänderung bei jeweils der angegebenen Konzentration.

[0048] Die gefundene lineare Abhängigkeit der relativen Größenänderung, die dem relativen Quellverhalten entspricht, von der Konzentration zeigt den Vorteil des Verfahrens zur quantitativen Analyse und macht deutlich, dass die Zugabe von Analyt bzw. das Verdünnen der ersten flüssigen Phase zur Bildung einer zweiten flüssigen Phase, bzw. des zweiten Mediums mit Analyt, eine Analyse erlaubt.

Beispiel 3: Messung bei unterschiedlichen pH-Werten

[0049] Der Einfluss des pH-Wertes auf die relative Volumenänderung für eine wässrige Lösung von Glycin ($c = 5 \text{ g/L}$) ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Messungen wurden entsprechend Beispiel 1 durchgeführt. Der beispielhafte Analyt Glycin wurde in wässriger Lösung bei pH-Werten größer als, gleich dem bzw. kleiner als der isoelektrische Punkt des Analyten mit verschiedenen Arten von Polymer kontaktiert. Tabelle 1 zeigt die relative Größenänderung verschiedener Polymere bei verschiedenen pH-Werten in Anwesenheit von Glycin (Gly).

Tabelle 1: Analyse von Glycin bei verschiedenen pH-Werten, Quellverhalten

ionische Form der Aminosäure	Polymer			
	Schwach saurer Kationenaustauscher	Polyacrylamid	Polyvinylalkohol	Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisat
Gly ⁺	0,55	0,68	1,03	0,98
Gly [±]	0,99	0,77	1,01	1,04
Gly ⁻	1,24	0,82	1,02	1,02

[0050] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung der relativen Größenänderung der Partikel bei verschiedenen pH-Werten der flüssigen Phase für denselben Analyten deutlich unterschiedliche stoffspezifische Ergebnisse ergibt und daher diese Ausführung des Verfahrens eine höhere Messgenauigkeit hat.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung der Konzentration zumindest eines in einer ersten flüssigen Phase in einer ersten Konzentration enthaltenen Analyten mit den Schritten

- Bereitstellen von zumindest zwei, jeweils mit einem Einlass und einem Auslass versehenen Kammern, in denen jeweils Partikel einer unterschiedlichen Art von vernetztem Polymer enthalten sind,
- Zuführen einer zweiten flüssigen Phase, die eine vorbestimmte zweite Konzentration des Analyten enthält, in jede Kammer,
- Zuführen der ersten flüssigen Phase in jede Kammer,
- Bestimmen der Abmessungen zumindest eines Partikels in jeder Kammer und Berechnen der relativen Änderung der Abmessungen zumindest eines Partikels für jede Art von Polymer bei Zuführen der ersten flüssigen Phase und bei Zuführen der zweiten flüssigen Phase,
- Korrelieren der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderungen der Abmessungen für jede Art von Polymer zur Konzentration des Analyten und
- Anzeigen der ersten Konzentration des Analyten, die sich aus dem Korrelieren ergibt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch

- das Messen und Einstellen des pH-Werts der ersten und der zweiten flüssigen Phase auf denselben pH-Wert,
- wobei der pH-Wert höher als, gleich dem oder niedriger als der pH-Wert des isoelektrischen Punkts des Analyten ist und die Art von Polymer ausgewählt ist aus sauren Kationenaustauscherharzen und basischen Anionenaustauscherharzen.

3. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zweite Konzentration des Analyten Null ist.

4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die erste und zweite flüssige Phase voneinander getrennt nacheinander jeder Kammer zugeführt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zweite flüssige Phase durch Zusetzen einer vorbestimmten Menge des Analyten oder von Wasser zu der ersten flüssigen Phase gebildet wird.
6. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zweite flüssige Phase mit Ausnahme der Konzentration des Analyten dieselbe Zusammensetzung aufweist wie die erste flüssige Phase.
7. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass zusätzlich der pH-Wert der ersten und der zweiten flüssigen Phase auf einen zweiten pH-Wert eingestellt wird und jede dieser flüssigen Phasen jeder Kammer zugeführt wird und die Abmessungen der Partikel bestimmt werden, die relative Änderung der Abmessungen zumindest eines Partikels für jede Art von Polymer bestimmt wird, die relative Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderungen der Abmessungen dieser Art von Polymer zur Konzentration des Analyten korreliert wird und die erste Konzentration des Analyten, die sich aus dem Korrelieren ergibt, für jede Art von Polymer angezeigt wird.
8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Partikel auf beabstandeten Tragelementen angeordnet sind.
9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Partikel in jeder Kammer spannungsfrei, ortsfest und lagefest angeordnet enthalten sind und das Zuführen ein Durchströmen der Kammern ist.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Partikel in einer ebenen oder gekrümmten Ebene angeordnet sind, in die sich die Tragelemente erstrecken, und die Kammer in einem Winkel von 30–120° zu dieser Ebene durchströmt wird.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Partikel aus unterschiedlicher Art von Polymer ausgewählt sind aus wasserunlöslichen, in Wasser quellfähigen Polymeren, die unterschiedliche Struktureinheiten und/oder einen unterschiedlichen Vernetzungsgrad und/oder unterschiedliche funktionale ionogene oder nicht-ionogene Gruppen und/oder keine Ladung aufweisen.
12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bestimmen der Abmessungen zumindest eines Partikels durch Aufnahmen von Bildern in den Kammern enthaltener vereinzelter Partikel mittels einer elektronischen Kamera während des Durchströmens erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass jeweils zumindest zwei Bilder in beabstandeten Ebenen vereinzelter Partikel aufgenommen werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11–13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bilder jedes Partikels zu jedem Zeitpunkt aus zwei Perspektiven aufgenommen werden.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bestimmen der Abmessungen zumindest eines Partikels mittels Laserbeugung erfolgt.
16. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Abmessungen der Partikel unmittelbar während des Zuführens der zweiten flüssigen Phase und während des Zuführens der ersten flüssigen Phase bestimmt werden und die Geschwindigkeit der relativen Änderung bestimmt wird und mit der Geschwindigkeit der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer mit einem vorbestimmten Verhältnis der Geschwindigkeit der relativen Änderungen der Abmessungen für jede Art von Polymer zur Konzentration des Analyten in der flüssigen Phase korreliert wird und die erste Konzentration des Analyten, die sich aus dem Korrelieren ergibt, angezeigt wird.
17. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die flüssige Phase, die die erste Konzentration des Analyten enthält, für vorbestimmte Zeitabschnitte mit einem vorbestimmten Anteil der flüssigen Phase versetzt wird, die eine von der ersten Konzentration abweichende und vorbestimmte Konzentration des Analyten enthält.

18. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche, die

- zumindest zwei, jeweils mit einem Einlass und einem Auslass versehene Kammern, in denen jeweils Partikel einer unterschiedlichen Art von Polymer spannungsfrei, ortsfest und lagefest angeordnet enthalten,
- eine Einrichtung zum Zuführen einer ersten flüssigen Phase, die eine erste Konzentration des Analyten enthält, und einer zweiten flüssigen Phase, die eine vorbestimmte zweite Konzentration des Analyten enthält, in jede der Kammern
- eine Einrichtung zum Bestimmen der Abmessungen zumindest eines Partikels in jeder Kammer, wobei die Einrichtung zum Berechnen der relativen Änderung der Abmessungen zumindest eines Partikels für jede Art von Polymer zwischen Zuführen der ersten flüssigen Phase und Zuführen der zweiten flüssigen Phase eingerichtet ist,
- eine Einrichtung zum Korrelieren der relativen Änderung der Abmessungen für jede Art von Polymer mit einem vorbestimmten Verhältnis der relativen Änderungen der Abmessungen für jede Art von Polymer zur Konzentration des Analyten in der flüssigen Phase und
- eine Anzeigeeinrichtung zum Anzeigen der ersten Konzentration des Analyten, die sich aus dem Korrelieren ergibt, aufweist.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, bei der jede Kammer beabstandete Tragelemente aufweist, auf denen die Partikel angeordnet sind.

20. Vorrichtung nach Anspruch 18 oder 19, gekennzeichnet durch eine Einrichtung zum Messen und Einstellen des pH-Werts der ersten und der zweiten flüssigen Phase auf denselben pH-Wert, wobei der pH-Wert höher als, gleich dem oder niedriger als der pH-Wert des isoelektrischen Punkts des Analyten ist und die Art von Polymer ausgewählt ist aus sauren Kationenauscherharzen und basischen Anionenauscherharzen

Es folgt eine Seite Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

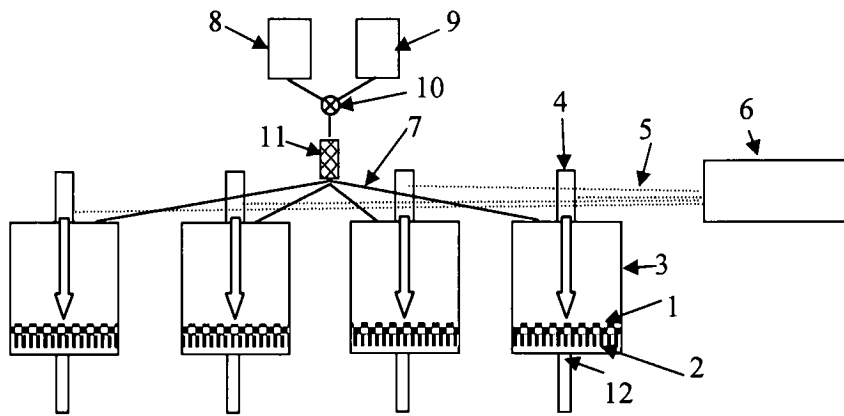
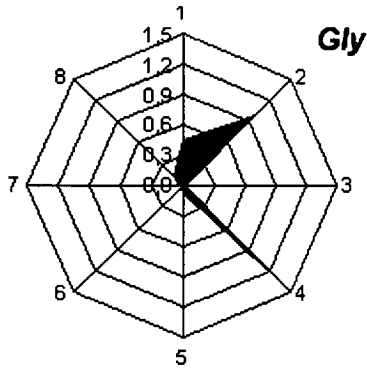
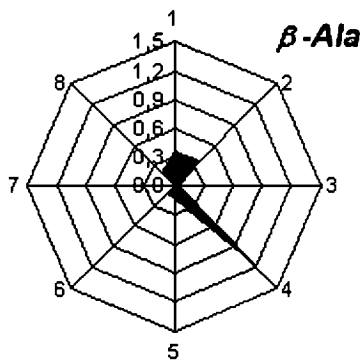


Fig. 2 A)



B)



C)

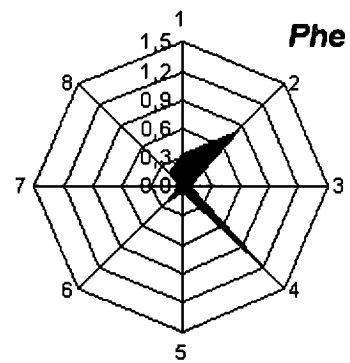


Fig. 3

