



(21) WP G 01 N / 284 674 3

(22) 13. 12. 85

(44) 16. 08. 89

(71) TESSEK, sdruzeni Praha, 11001 Praha 1, Krizovnická 3, CS

(72) Coupek, Jiri; Vozka, Stanislav, Dr.; Strejc, Borivoj; Tomsova, Zdenka, CS

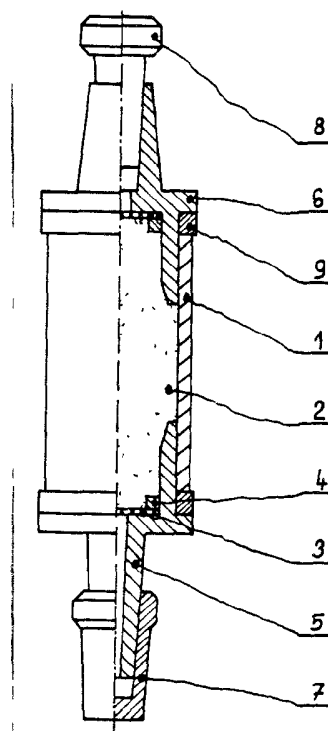
(74) Patentanwaltsbüro Berlin, Frankfurter Allee 286, Berlin, 1130, DD

(54) Speichercontainer zum Sammeln von Analysen

(55) Probenbehälter, Stoffanalysen, Sorbens, Sorbenssäule, Silikal-/Kopolymerträger, zylinderförmiges Kunststoffrohr, Verschlüsse, Sieb, Injektionsspritzenanschluß

(57) Die Erfindung bezieht sich auf einen Probenbehälter zum Auffangen, Aufbewahren, Transport und zur Aufbereitung von Proben aus den Bereichen der Chemie, Medizin, Biologie, Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie, der Toxikologie usw., die einer analytischen Bestimmung zugeführt werden sollen. Der erfindungsgemäße Probenbehälter besteht aus einem zylinderförmigen Rohr und zwei Endstücken für den Anschluß an eine Injektionsspritze, für eine Reihenschaltung mehrerer Probenbehälter und zum Verschließen und ist aus einem geeigneten Kunststoff hergestellt. Die Sorbenssäule ist an beiden Enden durch eine poröse Trennwand, durch ein Sieb oder eine Schicht aus Glasfaser- bzw. Quarzfaserwatte abgeschlossen. Die Sorbens-Teilchengröße liegt zwischen 20 und 150 µm. Bei Lagerung oder beim Transport ist der Behälterinhalt durch Verschlüsse an beiden Seiten geschützt. Das Sorbens zum Füllen des Behälters wird aus Silikagel- oder Kopolymerträgern spezifischer oder nichtspezifischer Funktionsgruppen zweckgebunden ausgewählt. Fig. 1

FIG. 1



Patentansprüche:

1. Probenbehälter, **gekennzeichnet dadurch**, daß er aus einem zylinderförmigen Rohr aus Kunststoff oder Glas, das mit dem Sorbens gefüllt ist, aus zwei Kunststoff-Endstücken mit einer porösen Trennwand, einem Sieb, einem Papierfilter oder einer Glas- bzw. Quarzfaser-Watteschicht besteht, wobei ein Endstück eine kegelförmige Mündung aufweist und das andere Endstück eine kegelförmige Öffnung derselben Konizität besitzt, was sowohl den Anschluß an eine Injektionsspritze oder die Reihenschaltung mehrerer Probenbehälter und das Verschließen der Probenbehälter mit Kunststoffverschlüssen ermöglicht.
2. Probenbehälter nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das zylinderförmige Rohr, die Endstücke und die Verschlüsse aus ausgewählten Kunststoffen der Gruppen Polyäthylen, fluoridierte Polyolefine, Polypropylen, Polyamid oder Polyvinylchlorid hergestellt sind.
3. Probenbehälter nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die poröse Trennwand aus Polyäthylen, Polypropylen, Polytetrafluoräthylen, Polyvinylchlorid oder Polyurethan hergestellt ist.
4. Probenbehälter nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Sieb aus Metall-, Glasfaser-, Polytetrafluoräthylen-, Polyamid- oder Polyestergerewebe hergestellt ist.
5. Probenbehälter nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Sorbens der zu analysierenden Stoffe, mit einer Teilchengröße im Bereich von 20 bis 150 µm, aus Silikagel oder seinen Derivaten C₁–C₁₈ Alkyl, CN, NH₂, NR₃ (wobei R = Alkyl), SO₃ oder aus einer Gruppe makroporöser organischer Polymere sphärischer Form mit immobilisierten selektiven Funktionsgruppen besteht, die aus Gruppen von Enzymen Enzyminhibitoren, Antikörpern, Antigenen oder aus kovalent gebundenen nichtselektiven Funktionsgruppen der Alkyle C₁–C₁₈, NR₃, NR₂, SO₃⁻, OPO₃²⁻ und COO⁻ (wobei R = Alkyl) ausgewählt wurden.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf einen Probenbehälter zum Auffangen, Aufbewahren, Transport und zur Verarbeitung von zu analysierenden Stoffen nach der Probennahme aus einer Quelle vor der eigentlichen analytischen Bestimmung. Die Erfindung wird in der allgemeinen chemischen und klinischen Analyse sowie Toxikologie, in der Umweltkontrolle bei Wasseranalysen, in der Landwirtschaft, in der Lebensmittelindustrie zur Analyse biologischer Proben und in der Biotechnologie eingesetzt.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Aufbewahrung und der Transport von Proben vor der Analyse stellen, ebenso wie die Isoliermethoden zum Erlangen des Verbindungssystems vor der finalen Analyse, ein ziemliches Problem dar und nehmen aus technischer und methodischer Sicht einen bedeutenden Anteil der zur Bestimmung vorgesehenen Zeit in Anspruch. Eine Verkürzung der für die eigentliche chemische, radiochemische oder Instrumentalanalyse erforderlichen Zeit ist eine selbstverständliche Forderung jeder modernen Bestimmungsmethode, so daß heute bei der Bestimmung des Gehalts der entsprechenden Komponenten in einer geeignet zubereiteten Probe mit jeder Minute gerechnet wird.

Üblicherweise verwendete und auf Extraktionsprozessen und folgender Verdichtung des Gemisches durch Lösungsmittelverdampfung beruhende Methoden einer Probenzubereitung sind anspruchsvoll an den Verbrauch von Chemikalien und deren Reinheitsgrad, an den Verbrauch chemischer Gefäße und Energieverbrauch, wobei sie allgemein auch sehr arbeitsaufwendig sind. Ebenso kann der Transport der entnommenen Proben im ursprünglichen Zustand von der Entnahmestelle zum Labor sehr langwierig und kostspielig sein, wobei auch eine Veränderung der Probenzusammensetzung nicht auszuschließen ist. Als Beispiele können spezielle Harnprobenanalysen angeführt werden, die nur in einigen wenigen Speziallabors in Großstädten vorgenommen werden, oder die Probennahme und Bestimmung von Spurenverunreinigungen in Ab- bzw. Oberflächenwässern oder die Probennahme und Bestimmung radioaktiver bzw. sehr toxischer Stoffe aus einem bestimmten Terrain.

Bei einer kritischen Betrachtung von Zeitaufwand und Kosten zur analytischen Bestimmung einer realen Probe wird klar, daß die mit Hilfe moderner Gerätetechnik vorgenommene eigentliche Finalanalyse unvergleichbar kürzer und kostengünstiger ist als die Arbeit zum Auffangen, Aufbewahren, Transport und zum Aufbereiten der Probe. Dieser Tatsache wurde bisher relativ wenig Aufmerksamkeit gewidmet.

Gegenüber bekannten Extraktionsmethoden weist die Sorptionstechnik auf einer festen Sorbensoberfläche eine ganze Reihe von Vorzügen auf. Insbesondere bei der Bestimmung sehr kleiner Konzentrationen zu untersuchender Verbindungen, wo — mit Hinblick auf die Volumina der Extraktionsmittel — deren absolute Reinheit eine entscheidende Rolle bei der weiteren Kontamination der Probe bei ihrer Aufbereitung zur Analyse spielt. Auf diesem Gebiet ist eine Lösung aus den USA zum Konzentrieren von Stoffen bekannt, die in der Nutzung eines radial kompressiblen Kunststoffes für die Zubereitung von Röhrchen mit dem festen Sorbens beruht. Der Nachteil dieses bekannten Verfahrens besteht in der Verwendung eines relativ kostspieligen Spezialkunststoffes, der außerdem eine besondere Verarbeitungstechnologie erfordert, was sich auch im relativ hohen Preis

dieser Erzeugnisse widerspiegelt. Weitere Nachteile ergeben sich aus den hydrodynamischen Verhältnissen bei der Probennahme mit dem Röhrchen und bei der Probendesorption und durch die erhöhte Gefahr einer nachträglichen Kontaminierung der sorbierten Probe bei einer längeren Lagerung über die offenen Röhrchenenden. Die Auswahl der Sorptionsmaterialie beschränkt sich bei diesem bekannten System auf nur zwei Grund-Sorbenten. Ähnliche Eigenschaften besitzen auch die bereits bekannten Vorkonzentriersäulen und die dazugehörigen Sorbenten.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Herstellungskosten zu senken und die Anwendungsmöglichkeiten derartiger Probenbehälter zu erweitern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen verbesserten Probenbehälter der eingangs genannten Art zu entwickeln. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß der Probenbehälter aus einem zylinderförmigen Kunststoffrohr, das mit einem Sorbens gefüllt ist, zwei Kunststoffendstücken mit einer porösen Trennwand aus Polyterafluoräthylen, Polypropylen, Polyvinylchlorid, Polyurethan oder einem Sieb aus Metall-, Glasfaser-, Polyamid-, Polyester- oder Polytetrafluoräthylengewebe, oder mit einer Trennwand aus Papier-, Glasfaser- oder Quarzfaserwatteschicht besteht. Die poröse Trennwand ist mit Hilfe des Ringes befestigt. Eines der Endstücke hat eine kegelförmige Mündung, das andere Endstück eine kegelförmige Öffnung gleicher Konizität, die einen Anschluß an eine Injektionsspritze, eine Reihenschaltung der Probenbehälter und ein Verschließen mit Kunststoffverschlüssen ermöglicht. Das zylinderförmige Rohr, die Endstücke und die Verschlüsse sind aus Kunststoffen wie Polyäthylen, Polypropylen, fluorierte Polyolefine, Polyvinylchlorid, Polyamid, Polystyrol oder aus Glas hergestellt. Der verwendete Sorbentstyp wird durch Farbringe gekennzeichnet. Der erfindungsgemäße Probenbehälter kann stets mit einem solchen Sorbens gefüllt werden, das der gegebene Zweck erfordert. Hierbei handelt es sich vorwiegend um nichtspezifisch sorbierende Materialien mit universeller Einsatzmöglichkeit, wie Silikagel (Kieselsäuregel) und seine Alkyl- (C_1 – C_{18}), Zyan-, Amin- oder Alkylamin-Derivate sowie um organische makroporöse sphärische Materialien vom Kopolymertyp, entweder unmodifiziert oder alkylt. Durch eine höhere Selektivität zeichnen sich Sorbenten aus, die auf einer anorganischen oder organischen makroporösen Matrix die inogenen Funktionsgruppen $-NR_3^+$, $-NR_2$, $-SO_3^-$, $-COO^-$ und OPO_3^{2-} tragen. Für besondere, sehr perspektiv erscheinende Verwendungszwecke, eignen sich hochselektive Sorbenten, die immobilisierte affine Liganden, wie z. B. Enzyme mit konvalenter Bindung, Enzyminhibitoren, Antikörper oder Antigene enthalten, ggf. auch synthetische Liganden. Die Verwendung dieser Sorbensarten mit dem erfindungsgemäßen Probenbehälter gilt als sehr hoffnungsvoll für den Einsatz in analytischen Bestimmungsgarnituren, vor allem in der klinischen Analyse und in der Landwirtschaft. Gegenüber den bisher bekannten Lösungen kann der Probenbehälter nach der Erfindung in weit größeren Bereichen eingesetzt werden. Beispielsweise in der allgemeinen chemischen und klinischen Analyse (Bestimmung von Hormonen, Gallensäuren, Zytostatika und deren Metaboliten, Drogen usw.), in der Umweltkontrolle, in der Landwirtschaft, in der Nahrungsmittelindustrie, in der Biologie und in der Biotechnologie (Vitamine, Sacharide, Pestizide, Karzinogene u. ä. sowie Enzyme, Inhibitoren, Antikörper usw.).

Im Vergleich zu bekannten Techniken der Probennahme des Aufbewahrens, der Aufbereitung und ggf. auch des Transportes von Proben zeichnet sich der Probenbehälter gemäß dieser Erfindung durch einen weit geringeren Zeit- und Kostenaufwand bei den Anwendern aus und ist herstellungstechnisch einfacher und somit kostengünstiger für den Hersteller als die bisher bekannten Systeme. Der Probenbehälter besteht außerdem ausschließlich aus rotationssymmetrischen Teilen, was das Anfertigen von Preßformen sehr erleichtert und eine Massenfertigung mit vollautomatisierter Montage ermöglicht.

Zu den bedeutsamen Vorzügen zählt die Möglichkeit einer auch langen Probenaufwandbewahrung im Behälter und eines bequemen Probentransportes mit Hinblick auf Form, kleine Abmessungen und Verschleißbarkeit des Behälters.

Nicht minder vorteilhaft sind auch Einsparungen an Lösungsmitteln und Reagenzien sowie die große Applikatikonsvariabilität dieser Probenbehälter gegenüber den bisher bekannten Systemen.

Bemerkenswert ist auch die besonders gute Reproduzierbarkeit und Rückgewinnung bei der Probendesorption aus dem Behälter, was bei vielfach wiederholtem Einsatz überprüft wurde.

Außerdem ist bei der Arbeit mit radioaktiven oder sehr toxischen Verbindungen die einmalige Verwendung des Probenbehälters ökonomisch sehr gut vertretbar.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert. Die dazugehörige Zeichnung zeigt den erfindungsgemäßen Probenbehälter im Teilschnitt.

Beispiel 1

Der Probenbehälter wurde aus Polypropylen hergestellt, wobei 1 das Rohr, 2 das Sorbens, 3 die poröse Trennwand, 4 der Innenring, 5 und 6 die Endstücke sowie 7 und 8 die Verschlüsse sind. Das Behältervolumen beträgt 1,5 ml, seine Länge 40 mm. In beiden Endstücken des Behälters ist ein Sieb 3 aus Polytetrafluoräthylen mit einer Maschenweite von $20\ \mu$ befestigt. Gefüllt ist der Behälter mit 350 mg sphärischem Silikagelsorbens mit kovalent gebundener Phase C_{18} (SEPARON C_{18}) und einer Teilchengröße von 50 bis $80\ \mu$. Vor der Benutzung wird der Behälter durch das Hindurchpressen von 5 ml Methanol und 5 ml Wasser gespült. Danach werden 2 ml des zu analysierenden Harns mittels Injektionsspritze hindurchgedrückt und anschließend mit 5 ml destilliertem Wasser erneut durchgespült. Der Behälter wird verschlossen und eingelagert oder zum Ort der Analysendurchführung transportiert.

Zur Analyse wird der Probenbehälter geöffnet, in seine obere Öffnung eine Injektionsspritze eingesetzt und die sorbierte Probe wird mit 2 ml Methanol verdrängt.

Dieses beschriebene Verfahren wurde bei Serienanalysen von Stereoidhormonen im Harn angewandt, wobei zur Finalanalyse die Gaschromatographie, eine radioimmunologische Bestimmung und eine Dünnschichtchromatographie eingesetzt wurden. Bei 24 Steroiden wurden die Rückgewinnungsquote bestimmt, die, im Schnitt gegenüber der üblichen Art einer Isolierung dieser Stoffe im Harn mittels Extraktionstechniken, um 35% höher liegt.

Der Arbeitsaufwand bei der Probenzubereitung verringerte sich bei Verwendung dieses Probenbehälters gegenüber der bisherigen Extraktionstechnik auf 5 bis 10%.

Beispiel 2

Der Probenbehälter gemäß Beispiel 1 wurde aus Polyvinylchlorid hergestellt. Anstelle der Siebe aus Polytetrafluoräthylen wurden die Endstücke mit einem Polyamidgewebe der Maschenweite von 15 µm versehen, das durch Teflonringe festgehalten wurde.

Dieser Behälter wurde zum Auffangen und Aufbewahren einer Modellprobe radioaktiv markierter Plasmasteroide in einer Menge von etwa 4 ng in 5 ml genutzt. Festgestellt wurden folgende Rückgewinnungsquoten:

Kortisol 95%, Estradiol 94%, Testosteron 92%, 18-OH-DOC 89% und Androstendion 90%.

Beispiel 3

Der Probenbehälter mit den gleichen Abmessungen wie im Beispiel 1 wurde aus Polyäthylen hergestellt und mit dem Silikagelderivat C₁₈ (SEPARON C₁₈) der Teilchengröße von 80 bis 120 µm gefüllt. Der Behälter ist beidseitig mit einem Teflonring und einem Teflongewebe versehen.

Dieser Behälter wurde zum Auffangen und Aufbewahren von Digitinglykosiden aus einem Kaninchen-Nebennierenextrakt eingesetzt. Mittels der Dünnschichtchromatographie wurde ein Festhalten von 11 Stoffen dieses Typs nachgewiesen. Dieses Verfahren wurde mit der Standard-Extraktionstechnik verglichen.

Beispiel 4

Der Probenbehälter entsprechend dem Beispiel 1 wurde aus Polyvinylidenfluorid hergestellt und mit sphärischem makroporösem Styrolkopolymer mit Äthylendimethakrylat (SEPARON SE) der Teilchengröße von 32 bis 40 µm gefüllt. Der Behälter wurde beidseitig mit einem Glasfasergewebe und einem Polytetrafluoräthylenring verschlossen.

Dieser Behälter wurde zum Auffangen aromatischer Kohlenwasserstoffe aus Wasser bei einem Gehalt von 20 bis 150 ng/ml Wasser — und zwar Koronen, Anthrathren, Dibenzofluoranthren, o-Phenylpyren, Benzo(a)Chrysen, Perylen, Benzo(a)Pyren, Fluoranthren und Anthrazen — eingesetzt. Nach einer drei Wochen andauernden Probenaufbewahrung im verschlossenen Behälter wurde die Desorption mit einem Äthanol/Äthergemisch (2 ml — 1:1) vorgenommen. Dabei lag die Rückgewinnungsquote in den Grenzen zwischen 93 und 100%. Die Analyse der einzelnen Komponenten erfolgte spektrofluorimetrisch.

Beispiel 5

Es wurde ein Probenbehälter nach Beispiel 4 mit dem Unterschied hergestellt, daß das Gefäß (Rohr) aus Polyamid bestand und zur Adsorption sphärisches Silikagel mit kovalent gebundener Phase (SEPARON SIX C₁₈) der Teilchengröße von 20 bis 50 µm verwendet wurde. Die Sorbenssäule wurde durch rostfreie Stahlsiebe mit einer Maschenweite von etwa 5 µm abgeschlossen. Die aufgefangene Probe und das angewandte Desorptionssystem waren dieselben wie im Beispiel 4. Die Rückgewinnungsquote lag zwischen 90 und 100%.

Beispiel 6

Bei dem verwendeten Probenbehälter, entsprechend Beispiel 1, wurden der zylinderförmige Behälterteil aus Glas und die Endstücke sowie Verschlüsse aus Polytetrafluoräthylen hergestellt. Die Füllung bestand aus einem sphärischen 2-Hydroxyäthylmethakrylat-Kopolymer mit Äthylendimethakrylat des Molekulargewicht-Ausscheidungslimits von 10⁶ Dalton, zusammen mit einem kovalent gebundenen spezifischen Pepsin-Inhibitor (Epsilon-Aminokaproyl-L-Ph-D-Phe-OMe) in einem Volumen von 0,5 µMol/g Träger, bei einer Teilchengröße von 100 bis 200 µm.

Das Auffangen und Auswaschen der Probe aus einem pepsinhaltigen Extrakt *Aspergillus oryzae* wurde mit einer Natriumazetatlösung 0,1 M vorgenommen, wonach der Behälter verschlossen und 48 h bei 4°C gelagert wurde. Die Desorption wurde mit einer Natriumazetatlösung 0,1 M, pH 4,5 mit einem NaCl-Gehalt von 1 M vorgenommen.

Das Beispiel 6 dient zur Demonstration des Probenbehältereinsatzes für eine biospezifische affinite Sorption.

Beispiel 7

Der Probenbehälter gemäß Beispiel 1 wurde mit dem sphärischen makroporösen Kationenaustauscherharz SEPARON 300 P gefüllt (ein 2-Hydroxyäthylmethakrylat-Kopolymer mit Äthylendimethakrylat und kovalent gebundenen Funktionsgruppen —OPO₃⁻, M_{w,lim} = 300 000 Dalton, Kapazität 3,0 mÄqv./g, Teilchengröße 20 bis 60 µm). Den Säulenabschluß bildete eine Trennwand aus porösem Teflon, befestigt mit Hilfe eines Teflonringes.

Das Auffangen zelulolytischer Enzyme aus der Kultivationslösung *Trichoderma viride*-resei erfolgte aus einer Natriumazetatlösung 0,005 M mit pH 4,0. Die Probe wurde 72 Stunden lang bei einer Temperatur von 4°C ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt. Die Desorption von der eigentlichen Analyse erfolgte mittels einer Natriumazetatlösung mit 3 M NaCl.

Dieses Beispiel dient zur Illustration einer Nutzung des mit einem makroporösen Kationenaustauscherharz gefüllten Analysenprobenbehälters.

Beispiel 8

Der Probenbehälter aus PVC mit einem Volumen von 2,5 ml wurde mit dem Anionenaustauscherharz SEPARON 1000 DEAE gefüllt (ein 2-Hydroxyäthylmethakrylat mit Äthylendimethakrylat und kovalent gebundenen Diäthylaminoäthyl-Funktionsgruppen, Kapazität 2,05 mÄquv./g, Teilchengröße 20 bis 40 µm). Die Säule wurde beiderseitig mit porösem Polyvinylchlorid abgeschlossen.

Das Auffangen eines Eiweißgemisches aus Humanserum erfolgte aus seiner Lösung in einem Puffer (0,025 M Phosphorsäure + Tris pH 8,5). Nach einem Durchspülen mit demselben Puffer wurde der Probenbehälter 48 Stunden lang bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt, wonach die sorbierten Eiweißstoffe durch eine Pufferlösung aus 0,5 M Phosphorsäure + Tris + 1 M NaCl pH 3,2 desorbiert und analysiert wurden.

Dieses Beispiel dient zur Demonstration einer Nutzung des mit einem makroporösen Anionenaustauscherharz gefüllten Analysenprobenbehälters.

FIG. 1

