



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 648 659 A5

⑤① Int. Cl.4: G 01 D 21/02
G 01 K 11/00
G 01 N 21/62

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 238/81

㉔ Anmeldungsdatum: 15.01.1981

㉔ Priorität(en): 18.01.1980 DE 3001669

㉔ Patent erteilt: 29.03.1985

㉔ Patentschrift
veröffentlicht: 29.03.1985

㉔ Inhaber:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., Göttingen (DE)

㉔ Erfinder:
Lübbbers, Dietrich Werner, Prof. Dr., Dortmund
(DE)
Völkl, Klaus-Peter, Dipl.-Chem., Lüdinghausen
(DE)
Opitz, Norbert, Dr., Dortmund-Lichtendorf (DE)

㉔ Vertreter:
Hepatex-Ryffel AG, Zürich

㉔ **Vorrichtung zur optischen Messung von physikalischen Grössen oder von Stoffkonzentrationen.**

㉔ Um Ausschwemmungen von Indikator- und/oder
Reaktionssubstanzen aus einem durch eine Membran
abgeschlossenen Raum zu verhindern, sind der Indikator-
stoff bzw. die Reagentien covalent mittels einer Mem-
bran immobilisiert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur optischen Messung von physikalischen Grössen, wie Temperatur oder Druck, oder von Stoffkonzentrationen, mit einer Strahlungsquelle, einen Monochromator, einen Lichtempfänger und eine Anzeigeeinrichtung enthaltenden Lichtmesseinrichtung und einem durch die Lichtmesseinrichtung vermessbaren, mindestens einen Indikatorstoff enthaltenden, durch eine Membran abgeschlossenen Raum, dadurch gekennzeichnet, dass der Indikatorstoff mittels der Membran covalent immobilisiert ist und/oder dass ein durch eine Membran abgeschlossener Reaktionsraum vorgesehen ist, in welchem ein Reagens mittels der Membran covalent immobilisiert ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran durch Polymerisation erzeugt ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran eine Polysaccharidmembran ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Polysaccharid Cellulose oder ein Cellulosederivat ist.
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran Silizium oder Siliziumderivate enthält.
6. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Indikatorstoff bzw. das Reagens unter Verwendung eines Brückenmoleküls covalent gebunden ist.
7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Brückenmolekül ein Silan ist.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Silan 3-(Triäthoxy-silyl)-propylamin ist.
9. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran aus Silikonkautschuk besteht.
10. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran aus Polyterephthalsäureglycolester besteht.
11. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein mehrfunktioneller Aldehyd als Brücke zwischen der Membran und dem Indikatorstoff bzw. dem Reagens vorgesehen ist.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Brücke aus Glutaraldehyd besteht.
13. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die wirksamen Stoffe in Mikrooptoden eingeschlossen sind.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran optisch wirkende Eigenschaften aufweist.

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur optischen Messung von physikalischen Grössen, wie Temperatur oder Druck, oder von Stoffkonzentrationen, mit einer Strahlungsquelle, einen Monochromator, einen Lichtempfänger und eine Anzeigeeinrichtung enthaltenden Lichtmesseinrichtung und einem durch die Lichtmesseinrichtung vermessbaren, mindestens einen Indikatorstoff enthaltenden, durch eine Membran abgeschlossenen Raum.

In bekannten Vorrichtungen dieser Gattung sind bisher die Indikatorstoffe in Membranen versiegelt worden. Diese Versiegelung muss bei der Messung von Teilchenkonzentrationen von diesen Teilchen durch Permeation überwunden werden. Die Menge der für die Messung zur Verfügung stehenden Teilchen ist also permeationsabhängig, so dass unter Umständen beträchtliche Zeitkonstanten für die Messung entstanden. Wurden andererseits die Membranen hinsichtlich der Permeation der zu messenden Teilchen verbessert, begann damit auch die Ausschwemmung der Indikatorstoffe aus dem diese enthaltenden Raum.

Es besteht demnach die Aufgabe, gleichzeitig die Ausschwemmung von Indikatorstoffen zu verhindern und den Penetrationswiderstand der Membranen zu verringern.

Es ist auch bekannt, neben den als «Optoden» bezeichneten Indikatorräumen noch Reaktionsräume zu verwenden, die zwar durch die Optoden optisch überwacht oder vermessen werden, deren Aufgabe es jedoch ist, den Raum, in dem gemessen wird, gezielt zu verändern. Beispielsweise kann ein Reaktionsraum benutzt werden, um eine im Messraum vorhandene Teilchenart durch eine andere, besser messbare Teilchenart zu replacieren, wie es beispielsweise bei der Messung von Glucose möglich ist: In einem in das Messobjekt verbrachten Reaktionsraum wird mittels eines Enzyms die Glucose umgesetzt, und der dabei verbrauchte Sauerstoff wird durch Verwendung von Optoden bestimmt. Da Glucose nicht unmittelbar optisch bestimmbar ist, der Sauerstoff jedoch mit Optoden, die z. B. Pyrenbuttersäure als Indikator enthalten, gut fluoreszenzoptisch messbar ist, dient der Reaktionsraum hier zur Replacierung von einer durch eine andere Teilchenart. Auch diese Replacierung ist diffusionslimitiert, weil das Enzym und die weiteren zur Reaktion erforderlichen Stoffe in eine Membranhülle eingeschlossen sind.

Hier besteht somit die der schon beschriebenen Aufgabe äquivalente Aufgabe, diese Limitierung zu verbessern.

Zur Lösung der einen und/oder der anderen der angegebenen Aufgaben ist die erfindungsgemässe Vorrichtung der eingangs definierten Art dadurch gekennzeichnet, dass der Indikatorstoff mittels der Membran covalent immobilisiert ist und/oder dass ein durch eine Membran abgeschlossener Reaktionsraum vorgesehen ist, in welchem ein Reagens mittels der Membran covalent immobilisiert ist.

Im ersten Fall, d. h. wenn der Indikatorstoff mittels der Membran covalent immobilisiert ist, ergibt sich der Vorteil, dass nunmehr der Penetrationswiderstand der Membran unabhängig von der Bindung des Indikators an den Raum ist. Es kann also, beispielsweise durch Ätzen einer Membran, diese auch für grosse Moleküle durchlässig gemacht werden, ohne dass ein zur optischen Messung dieser Moleküle vorgesehener Indikator von der Membran getrennt wird. Dadurch lassen sich schnell reagierende Indikatorfolien erstellen, die bei den «Optoden», wie solche, auf physikalische Grössen oder Teilchenkonzentrationen durch Farbänderung reagierende Messkörper bezeichnet werden, die bisher übliche Anordnung aus einer Membranhülle und einem darin eingeschlossenen Indikator durch eine einzige, mit dem Indikator besetzte Membran ersetzen.

Im zweiten Fall, wenn ein in einem Reaktionsraum enthaltenes Reagens mittels einer Membran covalent immobilisiert ist, besteht der Vorteil – ebenso wie bei der covalenten Bindung von Indikatoren an Membranen – in der gleichzeitig festen Verankerung und der leichten Erreichbarkeit der Reaktionsstoffe für die zu messenden Teilchen.

Die covalente Bindung von Indikatoren oder Reagentien oder von beidem an eine Membran führt also dazu, dass wegen der Trennung der Mittel zur Fixierung der in der Vorrichtung wirksamen Stoffe von den mechanischen Eigenschaften der Membranen, beispielsweise von deren Porosität, eine verbesserte Anpassung der Vorrichtung an die zu messenden oder zu beeinflussenden Teilchen möglich ist, dass dadurch die Spezifität der gesamten Vorrichtung für die zu messenden oder zu beeinflussenden Teilchen erhöhbar ist und dass gleichzeitig eine Homogenisierung der reaktiv wirkenden Oberflächen erreichbar ist, weil nicht nur geometrische, sondern auch stöchiometrische Bedingungen bei der Fixierung der wirksamen Stoffe an die Membran eingehalten werden. Dadurch ist sowohl die Eichbarkeit der Vorrichtung als auch deren Handhabung wesentlich verbessert. Auch ist die Haltbarkeit verbessert, insbesondere auch weil die Wirksamkeit der verwendeten Indikatoren bzw. Reagentien lösungsmittelunabhängig geworden ist.

Weiterhin sind jetzt einfache Stufenräume möglich, indem auf eine Seite einer Membran ein Indikator, auf der anderen Seite ein Reagens covalent gebunden wird. Dadurch wird eine Replacierung von einer Teilchenart durch eine andere und die gleich-

zeitige Messung durch den Indikator mit einer sehr geringen Zeitkonstante möglich, weil gleichzeitig eine grossflächige Darbietung von Reagens für den zu replacierenden Stoff und von Indikator für den replacierten Stoff gegeben ist, ohne dass es zu Verlust von Reagens oder Indikatorsubstanz durch Auswaschung kommen kann, wie bei den bisher verwendeten Versiegelungen.

Vorzugsweise ist die Membran durch Polymerisation erzeugt. Denn dadurch ist es möglich, die zur covalenten Bindung führende chemische Reaktion bei der Entstehung der Membran ablaufen zu lassen, so dass eine den wirksamen Stoff homogen enthaltende Membran entsteht.

Besonders geeignet sind dazu Polysaccharide aufgrund der vorhandenen reaktiven OH-Gruppen, wobei besonders die Cellulose die Möglichkeit bietet, wenige μm dicke Folien zu bilden. Ausserdem sind hierfür Verfahren bekannt, mit denen die Durchlässigkeit durch Permeation von Teilchen für weite Bereiche von Teilchengrössen beeinflussbar ist.

Eine andere Art von Vorteil bieten Membranen, die Silizium oder Siliziumderivate enthalten. Hier kann durch Silanisierung der Oberfläche die Möglichkeit geschaffen werden, über Brückenmoleküle Stoffe covalent zu binden, die sonst nicht mit der Membran reagieren würden. Silikonkautschuk ist ein solcher, zu Membranen verarbeitbarer Stoff, der zudem noch gut gasdurchlässig ist. Ist Wasserdampfdurchlässigkeit erforderlich, kann Polyterephthalsäureglycolesterfolie verwendet werden.

Als Mittel zur Silanisierung ist vor allem 3-(Triäthoxysilyl)-propylamin geeignet. Als Brückenmoleküle eignen sich auch mehrfunktionelle Aldehyde, wie beispielsweise Glutaraldehyd, sehr gut.

Insbesondere dann, wenn schnell reagierende Reaktionsoptoden geschaffen werden sollen, sind weitere Vorteile erreichbar,

wenn sowohl der Indikatorstoff als auch das Reagens vermittels einer Membran covalent immobilisiert sind.

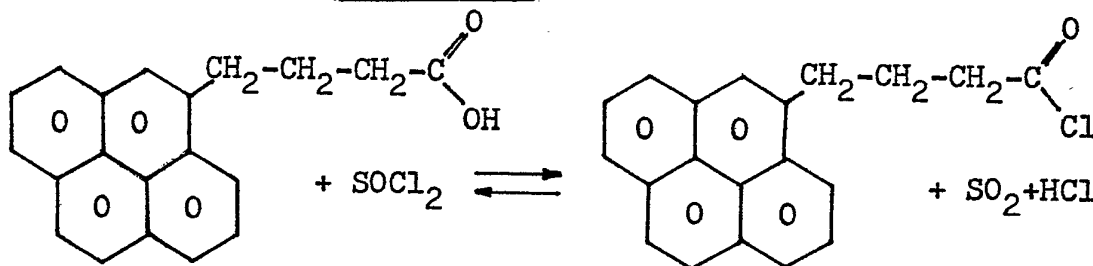
Es gelingt jedoch durch Verwendung von Brückenmolekülen nicht nur, Indikatoren oder Reagentien selbst an einer Membran covalent zu immobilisieren, sondern auch, in Mikrooptoden eingeschlossene Indikatoren dadurch an einer Membran zu immobilisieren, dass die Hülle der Mikrooptoden chemisch, beispielsweise mittels eines Silans, mit der Membran verbunden ist. Auch dadurch tritt noch einmal eine Erweiterung der Stoffgruppen ein, mit denen Teilchenkonzentrationen oder physikalische Parameter optisch erfassbar sind.

Falls es erforderlich sein sollte, kann die Membran mitsamt den covalent gebundenen wirksamen Stoffen, Reagentien und Indikatoren, durch bekannte Massnahmen, beispielsweise Schwärzungen, Verspiegelungen oder Mittel zur Verursachung von Streuungen, optisch wirksam gemacht werden, so dass sich im Einzelfall Erleichterungen bei der optischen Messung ergeben.

Nachfolgend werden einige Ausführungsbeispiele der Vorrichtung nach der Erfindung beschrieben, als erstes die Verbindung eines Sauerstoffindikators mit einem Polysaccharid.

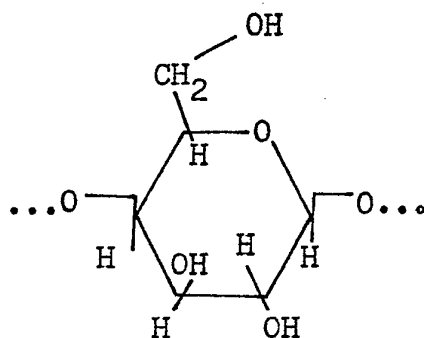
Ein Beispiel für ein solches System ist die Stoffkombination Cellulose-Pyrenbuttersäure, die zu einer dünnen, indikatorbesetzten Optodenfolie führt:

Die Bindung des Indikators an die Cellulose darf nur an den Stellen des Indikatormoleküls erfolgen, die keinen wesentlichen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Moleküls haben, über die ja die Messung (von Sauerstoff) erfolgt. Da der Einfluss der Carboxylgruppe auf die Fluoreszenz gering ist, bietet sich die Veresterung der Pyrenbuttersäure an die Cellophanfolie an. Dazu wird die Pyrenbuttersäure mit Thionylchlorid zu Pyrenbuttersäurechlorid umgesetzt:

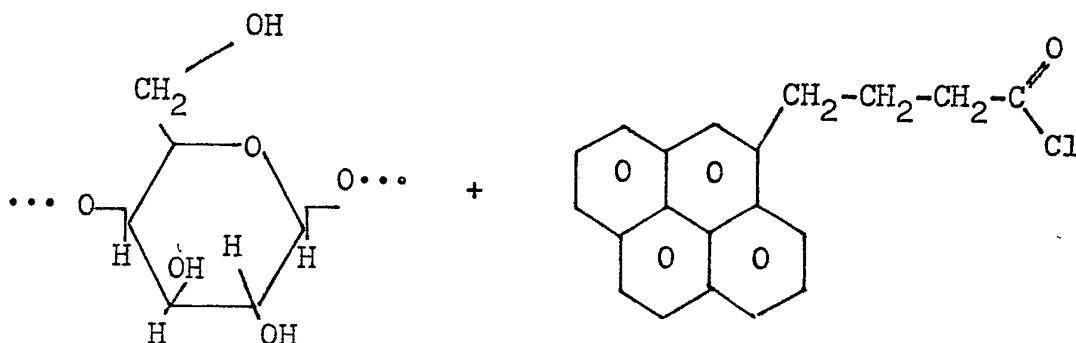


Sodann wird das Pyrenbuttersäurechlorid von überschüssigem

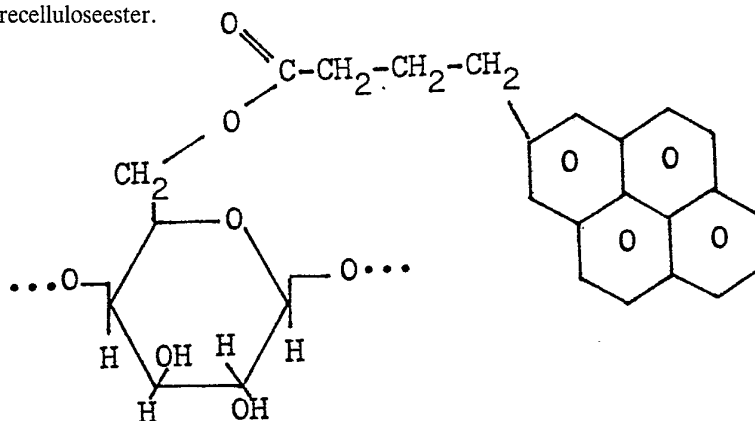
Thionylchlorid befreit, in Pyridin gelöst und mit Cellophanfolie



verestert:



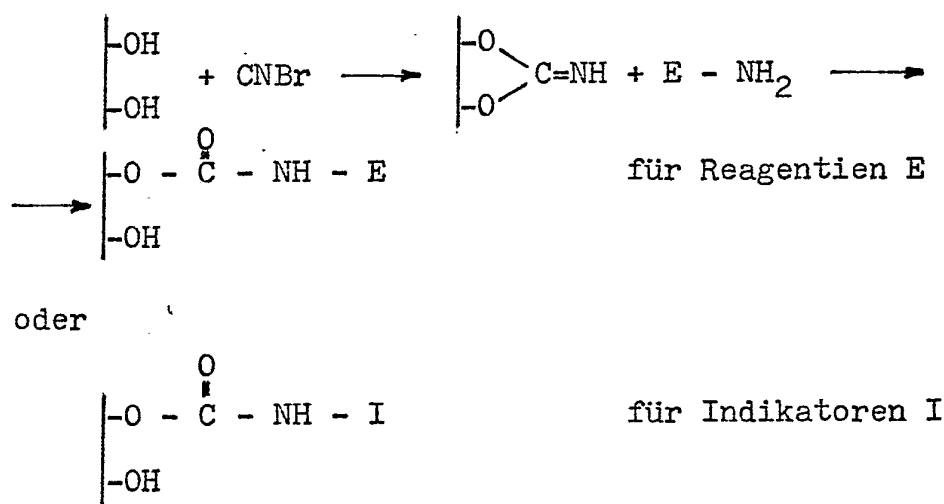
Dabei entsteht Pyrenbuttersäurecelluloseester.



Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften gegenüber der Pyrenbuttersäure treten dabei nicht auf. Die Reaktionszeit des an eine 12 µm dicke Cellophanfolie gebundenen Indikators liegt bei 2 bis 3 sek.

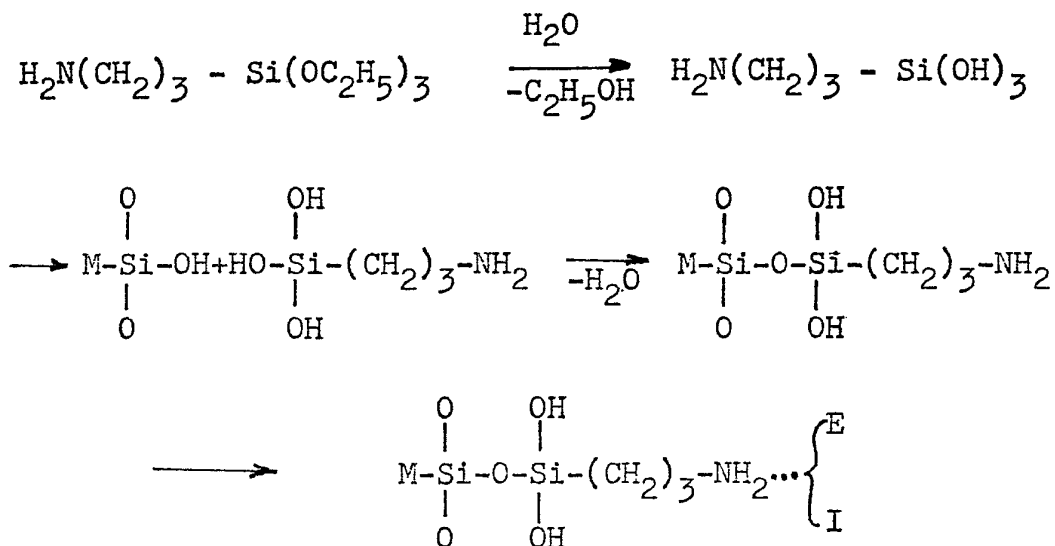
Die Möglichkeit sowohl Indikatoren I als auch Reagentien,

beispielsweise Enzyme E, covalent zu binden, ergibt sich durch die Verwendung von Bromcyan, wenn die Indikatoren oder die Reagentien freie Aminogruppen (wie die ε-Aminogruppe bei Lysin oder die α-Aminogruppen bei N-terminalen Aminosäuren) aufweisen, nach der folgenden Reaktion:

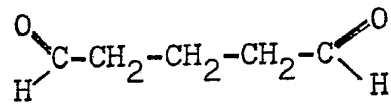
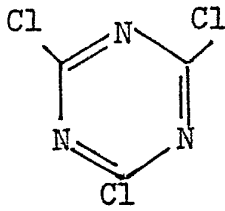


Ein weiteres Verfahren zur covalenten Bindung von Reagentien oder Indikatorsubstanzen ist die Silanisierung von Oberflächen, beispielsweise durch 3-(Triäthoxysilyl)-propylamin. Dabei entsteht eine Aminogruppe, an die die Reagentien oder Indika-

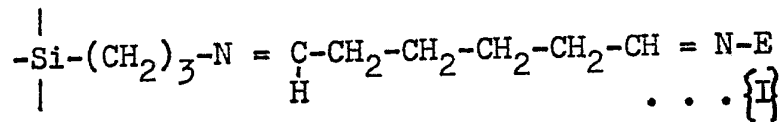
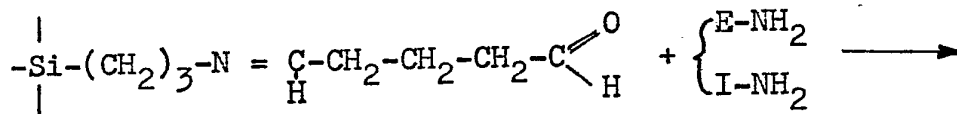
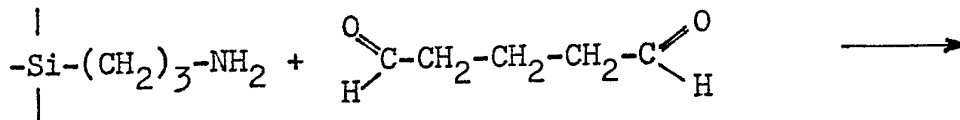
toren gebunden werden können nach der folgenden, beispielsweise auf eine Siliconkautschukmembran M wirkenden Reaktion:



An die Aminogruppe der aktivierten Membranoberfläche lassen sich nach bekannten Verfahren sowohl Indikatoren I als auch Enzyme E binden. Beispielsweise über Cyanurchlorid:



nach der Reaktion:



Diese Bindung ist sehr schonend, so dass sich dadurch auch Enzyme covalent immobilisieren lassen. Die Verbindung ist auch ein Beispiel für die Verwendung von molekularen Brücken

zwischen der Trägersubstanz (Membran) und den zu immobilisierenden Substanzen.