

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. März 2002 (28.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/25245 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 13/02

ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54,  
80636 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10389

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. September 2001 (08.09.2001)

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Michael  
[DE/DE]; Allgäuerstrasse 17d, 70599 Stuttgart (DE).  
BRUNNER, Herwig [AT/DE]; An der Betteleiche 6,  
70569 Stuttgart (DE). VITZTHUM, Frank [DE/DE];  
Zeppelinstraße 40, 71157 Hildrizhausen (DE). BERN-  
HAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6,  
72074 Tübingen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 47 007.6 22. September 2000 (22.09.2000) DE

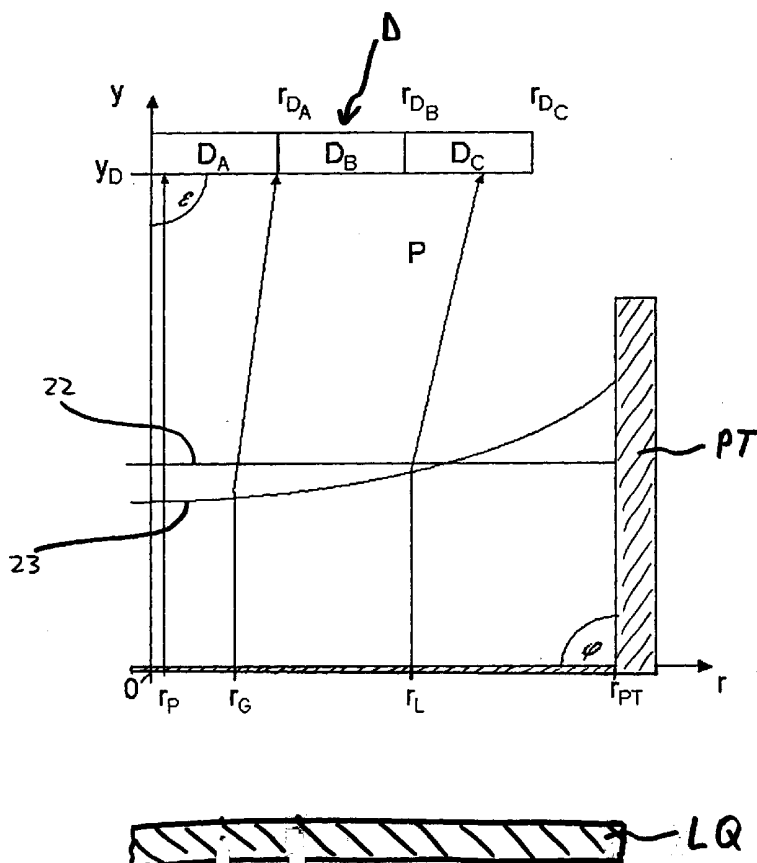
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-  
nahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT

(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse  
6A, 70469 Stuttgart (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING AN ANALYTE IN A SAMPLE HOLDER

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS EINES ANALYTEN IN EINEM PROBENTRÄGER



(57) Abstract: The invention relates to a method and device for detecting an analyte in a sample holder (PT). According to the invention, at least one liquid is provided in the sample holder, and the analyte is contained in and/or on top of a liquid, gaseous or solid uptake medium. To this end, the geometric configuration of an interface of the liquid is used for detecting the analyte in the sample holder by optically measuring a measured value that is dependent on the shape of the interface.

(57) Zusammenfassung: Es werden ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Nachweis eines Analyten in einem Probenträger (PT) beschrieben, wobei im Probenträger mindestens eine Flüssigkeit vorliegt und der Analyt in bzw. an einem flüssigen, gasförmigen oder festen Aufnahmemedium enthalten ist. Dabei wird die geometrische Ausgestaltung einer Grenzfläche der Flüssigkeit zum Nachweis des Analyten im Probenträger mittels optischer Messung eines von der Gestalt der Grenzfläche abhängigen Messwerts herangezogen.



WO 02/25245 A1



**(81) Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS EINES ANALYTEN IN EINEM PROBENTRÄGER

5 **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Nachweis eines Analyten in einem Proben-träger, wobei der Analyt gegebenenfalls in und/oder an einem flüssigen oder gasförmigen oder  
10 festen Aufnahmemedium enthalten ist unter Vorliegen mindestens einer Flüssigkeit.

Spektrophotometrische und luminometrische Verfahren zur Bestimmung von Analyten auf der Basis von Ab-sorptions- und luminometrischen Eigenschaften der  
15 Analyten sind bereits bekannt. Des Weiteren werden in bekannter Weise Nachweisreaktionen ausgenutzt, um spektrophotometrische oder luminometrische Effekte zu erzielen, mit deren Hilfe die Analyten indirekt nachgewiesen werden können. Diese bekann-  
20 ten primären Nachweisverfahren sind verhältnismäßig kompliziert, aufwendig und teuer.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung desselben bereit-zustellen, welche einen alternativen Nachweis eines  
25 Analyten in einem Proben-träger ermöglichen sollen, wobei gegebenenfalls lediglich sekundär die Spek-trophotometrie und/oder Luminometrie herangezogen werden soll.

Zur Lösung der Aufgabe wird ein Verfahren mit den  
30 Merkmalen des Anspruchs 1 vorgeschlagen, das sich

dadurch auszeichnet, dass die geometrische Ausgestaltung einer Grenzfläche der Flüssigkeit zum Nachweis des Analyten im Probenträger mittels Messung eines von der Gestalt der Grenzfläche abhängigen Messwerts herangezogen wird.

Als zu analysierende Substanzen, Analyten, kommen nicht nur reine Gase, Flüssigkeiten oder Feststoffe in Frage. Es ist ebenfalls möglich, Substanzen, die sich in Gasen, Flüssigkeiten, an Feststoffen oder Grenzflächen befinden, qualitativ und/oder quantitativ zu bestimmen. Das Verfahren bietet dabei nicht nur die Möglichkeit, die Eigenschaften im Gleichgewicht befindlicher, statischer Systeme zu erfassen, sondern auch die Kinetik dynamischer Systeme zu verfolgen. Beispielsweise kann die Diffusion grenzflächenaktiver Komponenten beziehungsweise deren Bildung oder Veränderung bei Reaktionen erfasst werden. Des Weiteren kann die Bindung und/oder Reaktion von Komponenten von Gasen und/oder von Flüssigkeiten mit oberflächengebundenen Partnern detektiert werden. Außerdem sind Reaktionen, im Speziellen enzymatisch katalysierte Reaktionen, die in Flüssigkeiten, an Oberflächen oder Grenzflächen ablaufen, erfassbar. Es ist ebenfalls denkbar, zwei oder mehr nicht mischbare Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Dichte einzusetzen. Gegebenenfalls kann auch ein Gas im Mehrkomponentensystem gegenwärtig sein. Somit können Wechselwirkungen an den Grenzflächen, flüssig-flüssig, flüssig-fest, flüssig-gasförmig und fest-gasförmig, untersucht werden. Beispielsweise ist es denkbar, grenzflächenaktive Enzyme, wie Lipasen, zu untersuchen. Es ist auch möglich, Grenzflächenpolymeri-

sationen zu verfolgen. Die Bestimmung erfolgt durch optische Systeme, so dass ergänzend beispielsweise spektrophotometrische und/oder luminometrische Techniken eingesetzt werden können.

- 5 Im Gegensatz zum Stand der Technik nutzt die Erfindung zur Bestimmung der Eigenschaften von Gasen, Flüssigkeiten und/oder Oberflächen somit nicht primär die spektrophotometrischen und/oder luminometrischen Eigenschaften der Analyte beziehungsweise der Nachweisreaktionen aus. Statt dessen be-  
10 dient sie sich der geometrischen Ausgestaltung (beispielsweise in Form einer Meniskenbildung) einer Grenzfläche einer Flüssigkeit, die sich in einem Probenträger befindet.
- 15 Menisken bilden sich in Abhängigkeit der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Oberflächen des verwendeten Probenträgersystems sowie der darin befindlichen Flüssigkeit(en) und/oder Gase. Diese Menisken führen zu lokalen Veränderungen der Höhe der  
20 Flüssigkeitssäule(n) und fungieren als optische Linsen. Unter Verwendung geeigneter Vorrichtungen kann mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens dies zur Bestimmung von Materialeigenschaften, im Besonderen der Polarität, von Flüssigkeiten und/oder  
25 Oberflächen und damit auch für den Nachweis von Analyten eingesetzt werden. Die Eigenschaften und/oder die Zusammensetzung von Gasen kann ebenfalls ermittelt werden.

30 Herkömmliche, verhältnismäßig aufwendige Nachweisreaktionen sind vorteilhafterweise nicht erforderlich. Es kann gegebenenfalls auf teure, analy-

tenspezifische, humantoxische und umweltgefährdende Reagenzien verzichtet werden. Da zeit- und materialaufwendige Nachweisreaktionen nicht durchgeführt werden müssen, beschleunigt sich der Nachweis, so dass Kosten weiter reduziert werden können. Außerdem stellt sich das Verfahren als äußerst flexibel und universell einsetzbar dar. Die Empfindlichkeit ist vorzugsweise sehr hoch, indem die Abmessungen der Probenträger klein gewählt werden, damit eine möglichst starke Meniskenbildung auftritt. Demnach werden vorzugsweise geringe Probenolumina eingesetzt. Außerdem sind die Messeffekte bei sehr geringen Analytkonzentrationen am deutlichsten. Zudem ist eine Parallelisierung und Automatisierung möglich. Attraktiv ist die Erfindung insbesondere für den Bio-Chip- beziehungsweise Lab-on-a-Chip-Bereich. Das neue Verfahren ist demnach nicht nur für einen sogenannten "Low-Sample-Throughput", sondern im Besonderen auch für einen "High-Sample-Throughput" erfolgreich einsetzbar.

Mit Vorteil wird der Analyt beziehungsweise die Flüssigkeit mit mindestens einem Lichtstrahl durchsetzt und eine von der geometrischen Ausgestaltung der Grenzfläche abhängige Lichtintensität mittels einer Detektoreinheit zum Nachweis des Analyten im Probenträger ermittelt. Ein den Analyt beziehungsweise die Flüssigkeit durchsetzender Lichtstrahl eignet sich besonders zum Nachweis des Analyten, da sich eine mittels der Detektoreinheit präzise messbare Änderung der Lichtintensität in Abhängigkeit der geometrischen Ausgestaltung beispielsweise eines Meniskus einstellt, welche Rückschlüsse wenigstens auf die Existenz des Analyten im Proben-

träger und gegebenenfalls eine qualitative Bestimmung und/oder Quantifizierung des Analyten zulassen.

5 Vorteilhafterweise erfolgt mittels der Detektoreinheit eine photometrische Messung oder eine luminometrische Messung. Sowohl eine photometrische als auch eine luminometrische Messung mittels der Detektoreinheit erlaubt einen reproduzierbaren und zuverlässigen Nachweis des Analyten in einem Proben-  
10 benträger, welche mit mindestens einem Lichtstrahl durchsetzt wird.

Vorzugsweise wird die Detektoreinheit unter Veränderung des Abstands zur Grenzfläche bewegt. Hierdurch ist es möglich, nachzuweisen, ob ein sich an  
15 der Grenzfläche einstellende Meniskus in Bezug auf die Detektoreinheit konkav oder konvex ausgebildet ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsvariante wird ein zwischen dem Meniskus und der Detektoreinheit  
20 angeordnetes optisches Linsensystem zur Messoptimierung bewegt. Dabei kann die Messung der Lichtintensität mittels der Detektoreinheit hinsichtlich der Messpräzision und/oder der Messfläche optimiert werden.

25 Zur Lösung der Aufgabe wird auch eine Vorrichtung zum Nachweis eines Analyten in einem Proben-  
vorgesprochen, welche die Merkmale des Anspruchs 9 aufweist. Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst einen Proben-  
30 träger zur Aufnahme eines gegebenenfalls in einem flüssigen, gasförmigen oder festen

Aufnahmemedium enthaltenen Analyten unter Vorliegen einer Flüssigkeit mit einer Grenzfläche, eine Lichtquelle zur Abgabe mindestens eines den Analyten beziehungsweise die Flüssigkeit durchsetzenden Lichtstrahls und eine Detektoreinheit zur Ermittlung einer von der geometrischen Ausgestaltung der Grenzfläche abhängigen Lichtintensität. Eine derart ausgebildete Vorrichtung eignet sich besonders zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei bei vorteilhafterweise die Ausgestaltung des Probenträgers, der Detektoreinheit und/oder der Lichtquelle flexibel an den jeweils nachzuweisenden Analyten in einem Probenträger angepasst werden kann. Dabei ist es beispielsweise möglich, die Detektoreinheit mit einer gekrümmten Detektoroberfläche zu versehen, zwischen Probenträger und Detektoreinheit ein zur Messoptimierung bewegbares Linsensystem vorzusehen und/oder die Detektoreinheit derart auszubilden, dass sie in Bezug auf den Probenträger mindestens einen frontalen Detektorabschnitt und/oder mindestens einen seitlichen Detektorabschnitt aufweist.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung.

Die Erfindung wird nachfolgend in mehreren Ausführungsbeispielen anhand einer zugehörigen Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

Figur 1 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung gemäß einer ersten Ausführungsform;



- Figuren 2A, 2B, 3 eine jeweils schematische Darstellung physikalischer Effekte an einem Meniskus;
- 5 Figuren 4A bis 4E eine jeweils schematische Darstellung von Lichtstrahlen mit unterschiedlichen Einfallswinkeln;
- 10 Figuren 5A bis 5J eine jeweils schematische Darstellung unterschiedlicher Ausführungsformen einer erfindungsgemäßen Vorrichtung beziehungsweise unterschiedlicher Ausführungsvarianten eines erfindungsgemäßen Verfahrens;
- Figuren 6 bis 8 verschiedene Versuchsergebnisse in Diagrammform;
- 15 Figur 9 das Ergebnis einer ortsabhängigen Signalauflösung in Abhängigkeit einer Detektorkrümmung in Diagrammform;
- 20 Figur 10 eine erfindungsgemäße Vorrichtung mit einem Linsensystem;
- Figuren 11A, 11B eine jeweils schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit planarer und mit gekrümmter Grenzfläche;
- 25 Figuren 12A, 12B eine jeweils schematische Darstellung verschiedener Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Scaneinheit;

- Figuren 13A, 13B eine jeweils schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit mehreren Lichtquellen oder mit Spiegeln;
- 5 Figur 14 eine schematische Darstellung eines Probenträgers mit zwei unterschiedlichen Flüssigkeiten;
- Figuren 15A, 15B eine jeweils schematische Darstellung eines Probenträgers mit drei unterschiedlichen Flüssigkeiten und
- 10 Figuren 16A, 16B eine jeweils schematische Darstellung eines Probenträgers mit Zu- und Abflusssystemen.

Die Grundzüge der erfindungsgemäßen Vorrichtungen  
 15 sowie Verfahren werden im Folgenden beispielhaft anhand des Einflusses kreisförmiger Menisken (M) bei vertikalen spektrophotometrischen Messungen von Flüssigkeiten in Probenträgern dargestellt (Figur 1 und 4). Die erfindungsgemäße Anordnung eines mit  
 20 einer Flüssigkeit gefüllten Probenträgers (PT) in Bezug auf einen Lichtstrahl (L) und einer Detektoreinheit (D) ist in Figur 1 schematisch dargestellt (Detektorelemente  $D_A$ ,  $D_B$ ,  $D_{etc.}$ ); ( $r_D$ ) Radius der Detektoreinheit; ( $r_G$ ) Grenzradius; ( $r_L$ ) Radius des  
 25 Lichtstrahls, ( $r_{PT}$ ) Innenradius des Probenträgers (PT) ortsabhängiger Verlauf des Teillichtstrahls, beziehungsweise eines Photons mit der x-Ausgangs-  
 koordinate ( $r_P$ ); ( $y_D$ ) Abstand der Detektoreinheit.

Die Detektoreinheit (D) besteht aus mindestens  
 30 einem Detektorelement ( $D_A$ ) und ist im vorliegenden

Beispiel mit drei Detektorelementen ( $D_A$ ,  $D_B$ ,  $D_C$ )  
versehen. Vorzugsweise sind mehrere Detektorele-  
mente mit jeweils möglichst kleinen Abmessungen,  
beispielsweise "Charge Coupled Device Detektoren",  
5 "Diodenarrays" und/oder Lichtleitersysteme beziehungs-  
weise "Lichtleiterarrays", zu verwenden. Gegebenenfalls kann sich eine Detektoroptik zwischen  
der Flüssigkeit und der eigentlichen Detektorein-  
heit (D) befinden. Die Detektoroptik kann aus Lin-  
10 sen oder Linsensystemen sowie Filtern, beispiels-  
weise Interferenzfilter, Polarisationsfiltern, etc.  
aufgebaut sein. Eine Einbeziehung von Gittersystem  
zur Spektralanalyse ist ebenfalls denkbar. Die pla-  
nare oder konkav beziehungsweise konvex gekrümmte  
15 Detektoreinheit kann in einem vorzugsweise vari-  
ablen Winkel ( $\varepsilon$ , Figur 1) zum gegebenenfalls trans-  
parenten, vorzugsweise planaren Boden des Proben-  
trägers angeordnet sein. Im Folgenden ist  $\varepsilon = 90^\circ$   
(Figur 1). In Figur 1 besitzt der Probenträger eine  
20 zylindrische ( $\varphi = 90^\circ$ ) Symmetrie. Andere Messungen  
sind ebenfalls denkbar.

In Figur 1 ist der Ausgangspunkt des Lichtstrahls  
(Lichtquelle LQ) unter den Probenträger (PT) und  
die Position der Detektoreinheit (D) darüber ange-  
25 legt. Inverse oder andere Systeme sind ebenfalls  
denkbar. Die Lichtquelle (LQ) kann durch den Ein-  
satz von Monochromatoren, beispielsweise Gitter  
oder entsprechende Filter sowie Polarisationsfil-  
tern und Linsensystemen beziehungsweise Lichtlei-  
30 tern, Lichtstrahlen mit verschiedenen Eigenschaften  
zur Verfügung stellen. Werden beispielsweise ra-  
diärsymmetrisch zylindrische Lichtstrahlen sowie  
Probenträger und Detektoreinheiten verwendet, ist

bei der x-Koordinate die Verwendung von Radien ( $r$ ) bezogen auf die Symmetrieachse mit  $r = 0$  sinnvoll. Die y-Koordinate umfasst die relevanten Bereiche der Flüssigkeitssäule im Probenträger als auch den  
5 Abstand der Detektoreinheit vom transparenten Boden des Probenträgers, der gleich Null gesetzt wird. Angaben der y-Koordinate, die sich auf die Flüssigkeitssäule beziehen, werden mit der Schichtdicke ( $d$ ) beschrieben, ansonsten wird  $y$  verwendet. Mit  
10 der Linie 22 in Figur 1 ist eine planare Grenzfläche dargestellt, während die Linie 23 einen konkaven Meniskus zeigt.

Bei der Ausbildung von Menisken kommt es zu verschiedenen Effekten, die sich zwar gegenseitig be-  
15 dingen, aber im Folgenden getrennt voneinander beschrieben werden. Zum Einen ändert sich bei einem Meniskus die Schichtdicke der Flüssigkeit kontinuierlich in Abhängigkeit der Krümmung des Meniskus (Figur 2), zum Anderen kommt es an der gekrümmten  
20 Grenzfläche zur Brechung des Lichtes (Figur 3). Dies macht den Linseneffekt eines Meniskus aus. Zudem kommt es zu einer Veränderung der Reflexion. Diese nimmt mit zunehmender Krümmung des Meniskus und dem Durchmesser des Lichtstrahls zu. Streueffekte machen sich kaum bemerkbar. Des Weiteren  
25 spielt der Radius der Detektoreinheit ( $r_D$ ) beziehungsweise der Detektorelemente ( $r_{D,A,B,etc.}$ ) und dessen Abstand vom Meniskus beziehungsweise vom Probenträgerboden eine Rolle (Figur 4). Um diesen Sach-  
30 verhalt mathematisch zu erfassen, wird ein Lichtstrahl mit Radius ( $r_L$ ) in Teillichtstrahlen mit bestimmten Radien ( $r_P$ ), unterteilt. Oberhalb eines bestimmten Grenzradius' ( $r_G$ ) des Teillichtstrahls

wird dieser aufgrund der Brechung das Detektorelement der Detektoreinheit mit Radius ( $r_D$ ), welche näher bei  $x = 0$  liegt, nicht mehr erreichen. Dies hat zur Folge, dass das Signal dieses Detektorelements abnimmt und somit die dort gemessene Intensität eines gebrochenen Lichtstrahls ( $I_B^D$ ), kleiner als die des gebrochenen Lichtstrahls ( $I_B$ ) oder des nicht gebrochenen Lichtstrahls ( $I$ ) ist. Werden Reflexion und Streuung vernachlässigt, kann  $I_B$  gleich  $I$  gesetzt werden. Bei  $I_B$  und  $I$  handelt es sich jeweils um Intensitäten von Lichtstrahlen, die ein Medium bereits durchquert haben und somit von den Intensitäten der Lichtstrahlen zu unterscheiden sind, welche in das Medium eingestrahlt werden ( $I_D$ ).

Zur weiteren Beschreibung der Erfindung am Beispiel des Einflusses kreisförmiger Menisken, bei vertikalen spektrophotometrischen Messungen von Flüssigkeiten in Probenträgern, wird die Bestimmung der Schichtdicke gesondert dargestellt. Die Schichtdicke kann über die Beschreibung der Krümmung des Meniskus erfasst werden. Diese Krümmung hängt überwiegend von den Eigenschaften der Flüssigkeiten und der Probenträgerwände sowie von der Gravitation ab. Beispielsweise sind bei der Bildung eines konkaven Meniskus die Adhäsionskräfte größer, als die Kohäsionskräfte. Im Extremfall sind die Adhäsionskräfte so groß, dass die Flüssigkeit die Probenträgerwand fast vollständig benetzt und sie damit annähernd unter dem Winkel  $\gamma = 0$  trifft. Ein entsprechend kleiner Probenträgerradius ( $r_{PT}$ ) kann daher eine beinahe halbkreisförmige Meniskenbildung ermöglichen (Figur 2A).

Der Wert für die Schichtdicke ( $d_{(M)}$ ) in Abhängigkeit des Meniskus bezogen auf  $r = 0$  berechnet sich nach dem Satz des Pythagoras für einen konvexen Meniskus zu:

$$5 \quad r^2 + (d_{(M)} - r_{PT})^2 = r_{PT}^2 \quad (1)$$

und für einen konkaven zu:

$$r^2 + (r_{PT} - d_{(M)})^2 = r_{PT}^2 \quad (2)$$

Da die binomischen Formeln gleich sind, resultiert eine quadratische Gleichung, die folgende Lösung  
10 liefert:

$$d_{(M);(1)/2} = r_{PT} \pm \sqrt{(-r_{PT})^2 - r^2} \quad (3)$$

Somit ergibt sich die Schichtdicke in Abhängigkeit des Radius ( $d_{(z)}$ ) an einem beliebigen Punkt (Z) auf einem konvexen Meniskus nach:

$$15 \quad d_{(z)} = d_{z=0} - d_{(M)} \quad (4)$$

und bei einem konkaven Meniskus nach:

$$d_{(z)} = d_{z=0} + d_{(M)} \quad (5)$$

Ferner berechnet sich die radiusabhängige Absorption ( $Abs_{(z)}$ ) bei spektrophotometrischen Messungen  
20 nach dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz zu:

$$Abs_{(z)} = \epsilon \cdot c \cdot d_{(z)} \quad (6)$$

Hierbei ist  $c$  die Konzentration des Chromophoren und  $\epsilon$  dessen molarer, dekadischer Absorptionskoeffizient bei einer bestimmten Wellenlänge. Als

Chromophor kann der Analyt selbst, ein Reaktionsprodukt, oder eine sonstige absorbierende Substanz, vorzugsweise jedoch eine Flüssigkeit dienen. In wässrigen Lösungen sind beispielsweise Messungen im infraroten Bereich vorteilhaft, da hier Wasser absorbiert. In Systemen mit mehreren Flüssigkeiten beziehungsweise auch mit einem Gas können die spektrophotometrischen Eigenschaften einer oder mehrerer Komponenten ausgenutzt werden. In der Regel wird der Winkel  $\gamma$  jedoch ungleich Null sein. Hierbei spielt die Wahl des Probenrätgerradius' eine Rolle. Es bilden sich daher nicht nur halbkreisförmige Menisken, sondern auch lediglich kreisförmige Menisken aus. Daneben ist es denkbar, dass sich Menisken mit ortsabhängigen Meniskenradien ( $R_{(r)}$ ) ausbilden (Figur 2B), die folgendermaßen beschrieben werden können:

$$R_{(r)} = \frac{r}{\cos \gamma}. \quad (7)$$

Beim Strahlengang muss hier berücksichtigt werden, dass kein Brennpunkt, sondern eine Brennwolke auftritt. In gewissen Grenzen kann dies jedoch vernachlässigt werden. Wird beispielsweise lediglich der Bereich des Meniskus betrachtet, der vom Lichtstrahl getroffen wird, kann diese lokale Gegebenheit auch ein ortsunabhängiger Meniskenradius ausreichend beschreiben.

Um die Schichtdicke funktionsunabhängig in die Berechnung der Absorption einzubeziehen, kann ein Lösungsansatz über die Bestimmung der mittleren Schichtdicke ( $d_m$ ) verwendet werden. Für die Berechnung der mittleren Schichtdicke wird der Mittel-

wertsatz der Integralrechnung herangezogen, mit dem sich folgendes ergibt:

$$d_m = \frac{1}{r_L} \int_{r=0}^{r_L} d_{(r)} dr. \quad (8)$$

5 Analog gilt für die Betrachtung des Volumens unter Einbeziehung der Winkelfunktionen ( $\chi = r \cos \varphi$ ;  $\gamma = r \sin \varphi$ ):

$$d_m = \frac{1}{\pi \cdot r_L^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{r_L} d_{(r)} r dr d\varphi \quad (9)$$

1. Fall; Grenzfall:  $r_L = r_{PT}$ ;  $d_m = d_{pG}$ ;

2. Fall; Regelfall:  $r_L < r_{PT}$ ;  $d_m \neq d_{pG}$ .

10 Im Vergleich zu einer planaren Grenzfläche und deren Schichtdicke ( $d_{pG}$ ) haben Lichtstrahlen mit Radien, die kleiner als der Probenräderradius sind, eine Veränderung der mittleren Schichtdicke zur Folge, sofern Reflexionserscheinungen am Probenträger vernachlässigt werden können. Nach dem  
15 Bougner-Lambert-Beerschen Gesetz:

$$\text{Abs} = \varepsilon \cdot c \cdot d_m, \quad (10)$$

ist das Messsignal, beispielsweise die Absorption, von Proben bei gleichen Volumina mit einer planaren Grenzfläche ungleich zu demjenigen mit einem Meniskus. Bei konkaven Menisken kommt es zu einer Erniedrigung des Messsignals, bei konvexen zu einer Erhöhung desselben.

20



Es ist zu berücksichtigen, dass nur im Grenzfall beziehungsweise unter idealen Bedingungen ein sphärischer Meniskus, sei es ein halbkreisförmiger oder nicht, entsteht. Daher kann nur bei idealen Bedingungen von einem Brennpunkt gesprochen werden.  
5 Kommt es zu Abweichungen, handelt es sich um eine Brennpunktwolke. Der Einfachheit halber wurde bei den Darstellungen und Berechnungen von einem definierten Brennpunkt ausgegangen. Näherungsweise treffen die Berechnungen auch für eine Brennpunkt-  
10 wolke zu.

Außerdem ist es denkbar, dass lediglich der Bereich des Meniskus betrachtet wird, der vom Lichtstrahl getroffen wird. Näherungsweise, bei einem nicht zu  
15 großen Lichtstrahldurchmesser, kann hier lokal ein konstanter Meniskenradius definiert werden, so dass ein Brennpunkt berechnet werden kann.

Neben der Schichtdickenänderung kann auch die Brechung des Lichtes analytisch ausgenutzt werden.  
20 Diese wird durch das Snelliussche Brechungsgesetz:

$$\frac{\sin\alpha}{\sin\beta} = \frac{n_{2(\text{Luft})}}{n_{1(\text{Flüssigkeit})}} = n_{1,2}, \quad (11)$$

beschrieben (Figur 3). Beim Übergang eines Lichtstrahls vom Medium 1 (Flüssigkeit A) in ein Medium 2 (Luft, andere Gase oder eine Flüssigkeit B, die  
25 mit Flüssigkeit A nicht mischbar ist) ist der Quotient der Sinuswerte von Einfallswinkel ( $\alpha$ ) und Brechungswinkel ( $\beta$ ) gleich dem umgekehrten Verhältnis der absoluten Brechungsindices ( $n$ ) beider Medien. In der Regel wird der Brechungsindex ( $n_{1,2}$ )  
30 von Stoffen gegenüber Luft angegeben.  $n_{1,2}$  ist nicht

nur vom Medium selbst abhängig, sondern auch von der Wellenlänge des betreffenden Lichtes. Diese sogenannte Dispersion wird empirisch ermittelt. Bei einer definierten Wellenlänge kann demnach der Brechungswinkel über den Einfallswinkel berechnet werden. Da der Einfallswinkel von der Tangentensteigung am Meniskus abhängig ist, kann die Brechung des Lichtes in Abhängigkeit des Meniskus über die Abhängigkeit der Tangentensteigung des Meniskus ( $m_{TM(r)}$ ) nach:

$$m_{TM(r)} = \frac{dy}{dr} = \tan \alpha, \quad (12)$$

ermittelt werden.

Die Intensität ( $I^D$ ), die an der Detektoreinheit gemessen wird, ergibt sich aus dem dort erzeugten Signal, beispielsweise der Spannung ( $U$ ), die von der Intensität des Lichtes, das heißt von der Anzahl der einfallenden Photonen und ihrer Energie, abhängt (Figur 4). Um diesen Sachverhalt zu beschreiben, wird die x-Koordinate ( $r_{PD}$ ) eines Teillichtstrahls, der auf die Detektoreinheit trifft, mit der x-Ausgangskoordinate des Teillichtstrahls ( $r_P$ ), dem Abstand zwischen der Detektoreinheit und der Meniskusoberfläche ( $y_D - d_{(M)}$ ) sowie dem Einfallswinkel folgendermaßen ermittelt (Figur 3):

$$r_{PD(r_P)} = r_P + (y_D - d_{(M)}) \tan(\beta - \alpha); \quad (13)$$

1. Fall:  $r_{PD(r_P)} \leq r_{DA}$ , der Teillichtstrahl trifft die Detektoreinheit beziehungsweise das Detektor-

- 17 -

element  $D_A$  (Figur 4B und C),

Die am Detektorelement  $D_A$  gemessene Intensität eines gebrochenen Lichtstrahls ( $I_B^D$ ) entspricht damit der Intensität eines gebrochenen Lichtstrahls ( $I_B$ ) sowie der eines nicht gebrochenen Lichtstrahls ( $I$ ):

$$I_B^D = I_B = I;$$

2. Fall:  $r_{PD} (r_p) > r_{DA}$ , der Teillichtstrahl trifft das Detektorelement  $D_A$  nicht (Figur 4D und E),

15

$I_B^D < I_B = I$ ; entsprechend nimmt die Intensität an einem benachbarten Detektorelement zu.

Um die Abhängigkeit der an der Detektoreinheit beziehungsweise den Detektorelementen gemessenen Intensität eines gebrochenen Lichtstrahls genauer zu untersuchen, wird die Photonendichte ( $Pd$ ) eingeführt. Die Photonendichte eines Lichtstrahls wird in Photonen pro Fläche ( $A$ ) und Zeit ( $t$ ) ausgedrückt:

$$Pd = \frac{P}{A \cdot t}. \quad (14)$$

Da das Zeitintervall der Messung durch die erfindungsgemäße Vorrichtung vorgegeben und nicht durch die Brechung beeinflusst wird, wird diese Gleichung auf:

- 18 -

$$Pd = \frac{P}{A}, \quad (15)$$

reduziert. Unter der Annahme, dass bei einem gebrochenen Lichtstrahl die Photonendichte quadratisch mit dem Abstand, beispielsweise ausgehend von einem virtuellen oder realen Brennpunkt ( $B_v$ ,  $B_r$ ) (Figur 4D und E), abnimmt, ergibt sich folgender Zusammenhang (Figur 4A):

$$\frac{(P/A)_1^2}{(P/A)_2^2} = \frac{y_2}{y_1}. \quad (16)$$


Darum gilt für die Photonendichte auf der Höhe  $y_D$  der Detektoreinheit ( $P_{yD}/A_{yD}$ ) bezogen auf die Photonendichte des aus der Flüssigkeit austretenden Lichtstrahls ( $P_m/A_m$ ) mit der mittleren Schichtdicke ( $d_m$ ):

$$P_{yD}/A_{yD} = P_m/A_m \cdot \sqrt{\frac{d_m}{y_D}}. \quad (17)$$

Mit der Photonendichte des in das Medium eintretenden Lichtstrahls  $P_0/A_0$ , ergibt sich für  $P_{yD}/A_{yD}$ :

$$P_{yD}/A_{yD} = P_0/A_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d_m} \cdot \sqrt{\frac{d_m}{y_D}}. \quad (18)$$

Da die Photonendichte bei  $y_D$  für den Lichtstrahlkegel und die Detektoreinheit ( $P_{yD}^D/A_{yD}^D$ ) gleich ist, gilt:

$$P_{yD}^D = P_{yD} \cdot \frac{A_{yD}^D}{A_{yD}}. \quad (19)$$

Demzufolge gilt für die Intensität eines gebrochenen Lichtstrahls an der Detektoreinheit beziehungsweise einem Detektorelement ( $I_B^D$ ) bei Radiärsymmetrie:

$$I_B^D = I_B \cdot \frac{r_{yD}^D}{r_{yD}^2}. \quad (20)$$

Hieraus ergibt sich am Detektorelement  $D_A$  (Figur 4) mit:

$$r_{y_D}^D \leq r_{y_{DA}};$$

$$1. \text{ Fall: } r_{y_D} \leq r_{y_{DA}}; I_B^D = I_B = I;$$

- 5            2. Fall:  $r_{y_D} > r_{y_{DA}}; I_B^D < I_B = I;$             entsprechend nimmt die Intensität an einem benachbarten Detektorelement zu.

Für die Absorption bedeutet dies für das Detektorelement ( $D_A$ ) im zweiten Fall eine Zunahme nach:

$$10 \quad Abs = \log_{10} \frac{I_0}{I_B^D} < \log_{10} \frac{I_0}{I_B} = \log_{10} \frac{I_0}{I}. \quad (21)$$

Aufgrund des quadratischen Zusammenhangs wird sich dies entsprechend stark bemerkbar machen. Das Auftreten von Reflexion führt mit zunehmender Krümmung des Meniskus sowie steigendem Lichtstrahldurchmesser ebenfalls zu einer Abnahme des Messsignals. 15 Veränderungen der Schichtdicke werden unter diesem Aspekt nur bei geringen Lichtstrahldurchmessern exakt erfasst werden können. Die Auswirkungen der Streuung werden sich in diesem Rahmen kaum bemerkbar machen. 20

Eine weitere Möglichkeit, den Sachverhalt der Auswirkungen der Brechung mathematisch zu fassen, liegt in der Berechnung der Fläche des Lichtstrahlkegels ( $A_{y_D}$ ):

$$25 \quad A_{y_D} = \int_{x_1}^{x_2} \int_{y_1}^{y_2} dx dy \quad (22)$$

und der an der Detektoreinheit beziehungsweise den Detektorelementen gemessenen Photonendichte eines gebrochenen Lichtstrahls ( $Pd_B^D$ ), anhand:

$$Pd_B^D = \int_{x_1}^{x_2} \int_{y_1}^{y_2} \frac{P_{y_D}}{A_{y_D}} dx dy. \quad (23)$$

5 Da es sich jeweils um Kreisflächen handelt, gilt auch hier:

$$A_{y_D} = \int_0^{2\pi} \int_{r_{y_D}=0}^{r_{y_D}} r_L dr_L d\varphi \equiv \pi r_{y_D}^2; \quad (24)$$

$$Pd_B^D = \int_0^{2\pi} \int_{r_{y_D}=0}^{r_{y_D}} \frac{P_{y_D}}{A_{y_D}} r dr d\varphi \equiv \frac{P_{y_D}}{A_{y_D}} \pi r_{y_D}^2 = Pd_{y_D} \frac{r_{y_D}^D}{r_{y_D}^2}. \quad (25)$$

Somit kann gezeigt werden, dass das erfindungsgemäße Verfahren und die dafür notwendige, erfindungsgemäße Vorrichtung zur Bestimmung der Eigenschaften von Flüssigkeiten und/oder Oberflächen geeignet ist. Analyte, die sich in der Flüssigkeit befinden und deren Eigenschaften verändern, können  
10 somit auch nachgewiesen werden.

In Figur 5 sind vereinfachte Ausführungen der erfindungsgemäßen Vorrichtungen sowie die Auswirkungen der Meniskenbildung bei Lichtstrahlen mit kleinen Radien (eine gepunktete Linie, Figur 5A, C und  
20 F) und großen Radien (zwei gepunktete Linien, Figur 5B, D, E, G, H, I und J) auf den Strahlengang und das Messsignal (S) ortabhängig (r) dargestellt. Die ortabhängige Darstellung der Messsignale ist hier zur Veranschaulichung lediglich schematisch und  
25 stark vereinfacht dargestellt.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen sind schematisch anhand Detektoreinheiten 1, Probenträgern 2 mit Seitenwänden 3, die über entsprechende Oberflä-

cheneigenschaften verfügen, einen in diesen Fällen transparenten Boden 4 und einer nicht näher definierten Lichtquelle 5 dargestellt. Die von der Lichtquelle 5 ausgehenden Lichtstrahlen durchqueren die Flüssigkeiten 7, welche alle dasselbe Volumen besitzen, aber entweder planare Grenzflächen oder Menisken ausbilden.

In Figur 5A und B ist der Sachverhalt bei Messungen mit einer planaren Grenzfläche dargestellt. Es ergeben sich lokal definierte Signale mit entsprechendem Ausmaß beziehungsweise Intensität in Abhängigkeit des verwendeten Lichtstrahls. Kommt es zur Ausbildung eines konkaven Meniskus (Figuren 5C, D und E), wird ein zentrierter Lichtstrahl mit kleinem Radius (Figur 5C) im Idealfall nicht gebrochen. Die Schichtdicke der Flüssigkeit im Zentrum nimmt bei einem konkaven Meniskus ab, so dass im Falle dieser photometrischen Messung das Signal, das heißt die Intensität, im Vergleich zu einer planaren Grenzfläche zunimmt. Für die Absorption bedeutet dies nach dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz eine Abnahme (siehe auch Figur 6).

Wird hingegen ein Lichtstrahl mit einem großen Radius verwendet, kommt es überwiegend zu einer Brechung des Lichtstrahls (Figur 5D). Damit verringert sich das Signal, erstreckt sich allerdings über einen weiteren Bereich. Wird nur eine Detektoreinheit betrachtet, führt die Abnahme des Signals bei photometrischen Messungen zu einer Intensitätsabnahme, die eine Absorptionzunahme nach sich zieht (siehe auch Figur 7). Ähnlich kann es sich bei luminometrischen Messungen verhalten (Figur 8).

Um Reflexionserscheinungen am Probenträger zu verhindern, kann es sinnvoll sein, den Probenträger entsprechend geometrisch zu gestalten. Beispielsweise kann eine kegelförmige Geometrie sinnvoll sein (Figur 5E). Es ist ebenfalls denkbar, planare oder annähernd planare Probenträger einzusetzen (Figur 5F). Außerdem kann es von Vorteil sein, Materialien einzusetzen, die Reflexionserscheinungen minimieren. Des Weiteren kann durch die Wahl entsprechender Flüssigkeitsvolumina eine Füllhöhe erreicht werden, die die Gefahr von Reflexionserscheinungen vermindert.

Werden konvexe Menisken gebildet, kommt es bei Lichtstrahlen mit kleinen Radien im Vergleich zu einer planaren Grenzfläche zu einer Erhöhung der Schichtdicke, damit zu einer Reduktion des Signals und schließlich bei photometrischen Messungen zu einem Anstieg der Absorption (Figur 5G). Entsprechend kann zwischen konkaven und konvexen Menisken unterschieden werden.

Bei der Verwendung von Lichtstrahlen mit großen Radien kann dies durch die Veränderung des Abstandes der Detektoreinheit zum Probenträger beziehungsweise zur Oberfläche der Flüssigkeit erfolgen (Figuren 5G, H und I). Konkave Menisken führen zu einer anderen Abhängigkeit der Signalintensitätsverteilung vom Abstand als konvexe Menisken.

Figur 6 zeigt das Ergebnis von Versuchen, bei denen wässrige Lösungen mit unterschiedlichen Rinderhämoglobinkonzentrationen gleicher Volumina in kegelförmigen Probenträgern aus unpolarem Material mit



identischen Abmessungen und einem Durchmesser auf Höhe der Meniskenbildung von circa 6 mm verbracht wurden. Die Lösungen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 977 nm vermessen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert lediglich Wasser, nicht Rinderhämoglobin. Es wurden Lichtstrahlen mit Radien im Mikrometerbereich mittig in die Proben eingestrahlt, so dass Brechungsvorgänge vernachlässigt werden konnten. Zur Detektion wurde ein Detektorelement mit konstantem Abstand vom Probenträger verwendet.

Die mit der Rinderhämoglobinkonzentration bis zu einem Maximum zunehmende, konkave Meniskenbildung war so nicht zu erwarten. Überraschenderweise lagerte sich offensichtlich Rinderhämoglobin an die unpolare Oberfläche des Probenträgers und erhöhte damit die Polarität der Oberfläche des Probenträgers, wodurch die Adhäsionskräfte zunahmen. Unerwartet war auch die sehr deutliche Abnahme der Schichtdicke, die sich in einer signifikanten Reduktion der Absorption widerspiegelte (siehe auch Figur 5C). Proben, die kurz vor der Messung stark geschüttelt wurden (o), lieferten überraschenderweise andere Daten, als Proben, die nach dem Schütteln noch eine gewisse Zeit bei Raumtemperatur inkubiert wurden (□). Zum Vergleich wurden Proben in Küvetten (Δ) vermessen, die das Ausbilden von Menisken unterdrücken.

Die Schichtdicke ist hier konstant und damit auch die Absorption von der Rinderhämoglobinkonzentration. Die Deutlichkeit des Effektes, im Besonderen bei extrem niedrigen Rinderhämoglobinkonzentratio-

nen, verdeutlicht die Effektivität des erfindungs-  
gemäßen Verfahrens.

Bei den Versuchen gemäß Figur 7 wurde wie bei dem  
in Figur 6 dargestellten Versuch verfahren. Aller-  
5 dings wurde hier eine Humanhämoglobinbestimmung  
nach Drabkin (Drabkin und Austin, J. Biol. Chem.,  
98, 719, 1932) durchgeführt. Zur Messung wurde ein  
Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 540 nm und  
einem Radius von etwa 2 mm eingesetzt.

10 Die Absorption stieg mit zunehmender Humanhämoglo-  
binkonzentration bei der Verwendung von Küvetten  
(■) mehr oder minder linear an. Im Gegensatz hier-  
zu lieferte die Verwendung des innovativen Systems  
(●) eine dihyperbole Kurve mit deutlich erhöhter  
15 Empfindlichkeit.

Ab einer bestimmten Hämoglobinkonzentration wurden  
die Steigungen der beiden Kurven vergleichbar, so  
dass der Beitrag des Chromophoren unter Berücksich-  
tigung der Veränderung der Schichtdicke ermittelt  
20 werden kann.

Mit einer weiteren analogen Versuchsanordnung  
zeigte sich gemäß Figur 8, dass die von der Analy-  
tenkonzentration abhängige Meniskenbildung auch  
mittels einer luminometrischen Messung ausgewertet  
25 werden kann. Hierzu wurde die Fluoreszenz von  
Schweineherzdiaphorase bei 365 nm angeregt.

Mit dem erfindungsgemäßen System (○) ergab sich ein  
annähernd dihyperboler Verlauf, im Gegensatz zu den  
Versuchen, bei denen Küvetten (□) verwendet wur-  
30 den. Hier zeigte sich ein linearer Zusammenhang.

Die relative Fluoreszenz ergab sich aus der Integration über eine definierte Kreisfläche der Proben-träger von etwa 4 mm.

In Figur 9 wird deutlich, dass es von Vorteil sein  
5 kann, gekrümmte Detektoren ( $D_{1,5}$ ), beispielsweise ein "Charge Coupled Device", ein "Diodenarray" oder vorzugsweise ein "Lichtleiterarray", einzusetzen. Die ortsabhängige Auflösung der Signale bei gekrümmter Detektorgeometrie unterscheiden sich von  
10 einem planaren Detektor ( $D_3$ ). Dies kann vorteilhaft ausgenutzt werden. Es ist ebenfalls denkbar, einen planaren Detektor um einen bestimmten Winkel  $\epsilon$  ( $D_{2,4}$ ) (siehe auch Figur 1) zu neigen, um ihn dann rotieren zu lassen. Demnach ist es auch denkbar,  
15 einen Detektor einzusetzen, dessen Detektorelemente nicht flächig, sondern lediglich linienförmig aneinandergereiht sind. In Konsequenz kann ebenfalls ein einziges Detektorelement in einem entsprechenden, räumlichen Scanbetrieb eingesetzt werden.

20 Aber auch durch entsprechende optische Linsensysteme, wie beispielhaft in Figur 10 dargestellt, kann die Detektion in einer vorteilhaften Weise erfolgen. Eine optische Linse oder ein Linsensystem 9 kann durch die Bewegung gemäß Doppelpfeil 10 im  
25 Raum, gegebenenfalls durch Änderung von Brechungseigenschaften, das Signal beeinflussen. In Abhängigkeit des Meniskus und der Änderung des Linsensystems ergeben sich definierte Signale, die zum Nachweis beziehungsweise zur Bestimmung eines Ana-  
30 lyten herangezogen werden können.

Auf die Variationsmöglichkeit des Lichtstrahlradius durch Blenden, optische Systeme oder "Lichtleiterarrays" wurde bereits in der Beschreibung der Figur 5 eingegangen. In Figur 11 ist beispielhaft dargestellt, wie optische Linsen beziehungsweise Linsensysteme 11 in einer ebenfalls vorteilhaften Weise bei der Generierung von Lichtstrahlen eingesetzt werden können. In den Abbildungen wurde auf die Darstellung der Brechung an planaren Flächen verzichtet. Wird die Position des Brennpunktes in einem System variiert (Doppelpfeil 12; gepunktete und gestrichelte Linien), ergeben sich bei einer planaren Grenzfläche (Figur 11A) andere Brechungseigenschaften als bei einer gekrümmten Grenzfläche (Figur 11B). Entsprechend sind die Signale unterschiedlich, so dass ein Analyt auch auf diesem Wege detektiert werden kann.

In den Figuren 12A und 12B ist die Möglichkeit eines Scanbetriebs dargestellt. Dieser kann von unten (Figur 12A) erfolgen. Vorzugsweise wird hier ein Lichtstrahl mit einem möglichst geringen Radius eingesetzt. Bezüglich einer zentrierten Position (gepunktete Linie, Figur 12A) liefert eine Translokation (Doppelpfeil 13, Linie mit langen Strichen, Figur 12A) und/oder die Variation des Winkels  $\delta$  (Linie mit kurzen Strichen, Figur 12A) bestimmte Signale in Abhängigkeit des Meniskus. Wird der Probenträger von Detektorsystemen 1 umschlossen, kann die Signalerfassung optimiert werden. Beispielsweise kann der Anteil der Reflexion (dünn gestrichelte Linien, Figur 12A) erfasst werden. Gegebenenfalls ist die Detektion der Streuung ebenfalls möglich.

- Wird der Lichtstrahl seitlich eingestrahlt (Figur 12B), kann im Besonderen die Totalreflexion ausgenutzt werden (gepunktete Linie). Des Weiteren kann eine Messung mit definierter Schichtdicke (gestrichelte Linie) erfolgen, so dass die Konzentration eines Chromophoren auf herkömmliche Weise ermittelt werden kann. Damit kann der Anteil der Meniskenbildung am Messeffekt unabhängig von der Absorption des Chromophoren erfasst werden.
- 10 Neben den anhand der Figuren 7, 8 und 12B beschriebenen Möglichkeiten zur Ermittlung des Beitrags der Chromophoren zum Messeffekt gibt es weitere Optionen. Beispielsweise kann die Bestimmung auch dadurch erfolgen, dass die Proben zusätzlich in
- 15 Küvetten mit definierten Schichtdicken durchgeführt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Lichtquelle 5 und die Detektoreinheit 1 entsprechend Figur 13A so zu drehen, dass neben einer vertikalen auch eine horizontale Messung erfolgen
- 20 kann. Es ist natürlich ebenfalls denkbar, eine zweite Lichtquelle 5' und eine zweite Detektoreinheit 1' vorzusehen. Des Weiteren kann ein System von Spiegeln 14, wie in Figur 13B dargestellt, eingesetzt werden. Lichtleitersysteme können ebenfalls
- 25 statt des Spiegelsystems verwendet werden.

Die Erfindung umfasst ebenfalls den Einsatz von Systemen mit mehreren Phasen beziehungsweise Flüssigkeiten. In Figur 14 ist beispielsweise ein System bestehend aus zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten A und B dargestellt. Flüssigkeit B besitzt in diesem Fall eine geringere Dichte als Flüssigkeit A. Die Ausformung der Grenzfläche

30

flüssig-gasförmig der Flüssigkeit B kann in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen planar, konkav oder konvex sein. Bei entsprechender Kombination kann dies vorteilhaft zu einer Verringerung oder Verstärkung der Brechungs-, Reflexions- und Streueffekte sowie Schichtdickenänderung führen.

Eine planare Grenzfläche entsteht immer dann, wenn der Probenträger exakt bis zum Rand mit Flüssigkeit B gefüllt ist. Wird diese Grenze überschritten, bildet sich immer ein konvexer Meniskus, bis es zum Überlaufen der Flüssigkeit kommt.

Vorzugsweise besitzt die Flüssigkeit B einen entsprechend hohen Siedepunkt, so dass diese als Verdunstungsschutz für die Flüssigkeit A eingesetzt werden kann. Entsprechend können Messungen auch bei hohen Temperaturen, die gegebenenfalls sogar über dem Siedepunkt der Flüssigkeit A liegen, durchgeführt werden.

Neben der Verwendung von zwei Flüssigkeiten ist auch der Einsatz weiterer Flüssigkeiten denkbar. In einer speziellen Ausführungsform kann dies auf besondere Art und Weise ausgenutzt werden. In Figur 15 ist dies dargestellt. Neben dem Einsatz einer dritten Flüssigkeit C, kann gegebenenfalls auch die Bildung der Phasengrenze zwischen Flüssigkeit A und B ausgenutzt werden. Im Speziellen ist es denkbar, Substanzen einzusetzen, die über spektrophotometrische und/oder luminometrische Eigenschaften verfügen und sich vorzugsweise im Bereich der Phasengrenze aufhalten. Vorzugsweise sind bei dieser Ausführung die Vorrichtungen mit Lichtleitern oder

"Lichtleiterarrays" zu versehen, die sowohl Lichtquelle 5 als auch Detektor 1 sein können. Kommt es zur Ausbildung einer planaren Phasengrenze (Figur 15A) kann ein Lichtstrahl 6, ausgehend von einem bestimmten Lichtleiter 16, die Phasengrenze beziehungsweise Flüssigkeit C durchstrahlen, um dann auf das gegenüberliegende Lichtleiterelement zu treffen. Bildet sich ein schwacher Meniskus, kann durch Totalreflexion innerhalb der Phasengrenze beziehungsweise innerhalb der Flüssigkeit C der Lichtstrahl gegenüberliegende Lichtleiter prinzipiell noch erreichen. Nimmt die Krümmung des Meniskus zu, ist dies nicht mehr möglich. Zunächst kommt es zur Brechung, dann zu der in Figur 15B dargestellten Totalreflexion. Um diese festzustellen, kann es sinnvoll sein, ebenfalls oben und unten Detektoren einzusetzen.

Die Verwendung von Detektoren an diesen Stellen wird im Besonderen für luminometrische Messungen wichtig sein. In Abhängigkeit der Gestalt, planar, konkav oder konvex, der Phasengrenze beziehungsweise Flüssigkeit C, verändert sich die Verteilung der Lumineszenz. Dies kann durch Detektoren, die oberhalb beziehungsweise unterhalb angebracht sind, besonders gut erfasst werden (siehe auch Figur 8).

Gegebenenfalls kann es ausreichend sein, einen Lichtleiter oder ein "Lichtleiterarray" lediglich auf einer Seite einzusetzen, da die Lumineszenz oder die Reflexion bei photometrischen Bestimmungen im Bereich der Flüssigkeit A, B und der Phasengrenze beziehungsweise Flüssigkeit C unterschiedlich sein kann. Durch den Einsatz von Substanzen

mit entsprechenden spektrophotometrischen und/oder  
luminometrischen Eigenschaften, die sich spezifisch  
in der Phasengrenze oder den Flüssigkeiten aufhal-  
ten, kann die Effizienz der Messung verbessert wer-  
den. Es ist ebenfalls denkbar, Substanzen zu ver-  
wenden, die als Fluoreszenzlöscher fungieren, um so  
optimale Messsignale zu erhalten.

Des Weiteren können die Lichtstrahlen der jeweili-  
gen Lichtleiterelemente gleichzeitig oder nachein-  
ander eingestrahlt und ein Scan durchgeführt wer-  
den. Außerdem ist es denkbar, mindestens eine Flüs-  
sigkeit durch ein Gel oder eine andersartige Matrix  
zu ersetzen.

In Figur 16 sind Kammersysteme dargestellt, die mit  
Zu- und Abflusssystemen 17, 18 für die Flüssigkeit  
oder das Gas B sowie Zu- und Abflusssystemen 19, 20  
für die Flüssigkeit oder das Gas A ausgestattet  
sein können. Auch sind Aufbauten denkbar, bei denen  
lediglich eine Zuleitung als Zu- und Abfluss für  
die jeweilige Flüssigkeit oder gar für beide einge-  
setzt wird. Mit den Systemen ist es beispielsweise  
denkbar, Volumenverhältnisse zu variieren. Bei-  
spielsweise kann ein erfindungsgemäßes Verfahren  
hilfreich sein, bei dem eine Flüssigkeit zunächst  
bestimmte Oberflächenbereiche benetzt und dann ver-  
drängt wird. Erst durch diese Verfahrensweise bil-  
den sich Menisken in einer bestimmten Weise aus.  
Ähnlich kann mittels Schütteln des Probenträgers  
verfahren werden (Figur 6). Zudem kann es sinnvoll  
sein, hierbei bestimmte Inkubationszeiten oder Tem-  
peraturbedingungen einzuhalten.



Es ist beispielsweise ebenfalls denkbar, einen Analyten in einer ersten Flüssigkeit in einen Probenträger zu überführen, dessen Oberfläche so funktionalisiert wurde, dass diese hochaffin für den Analyten ist. Sollte sich durch die Bindung des Analyten noch kein ausreichender Meniskus ausbilden, kann die erste Flüssigkeit durch eine zweite Flüssigkeit ausgetauscht werden, welche bei Anwesenheit des Analyten an der Probenträgeroberfläche einen charakteristischen Meniskus ausbildet.

Das "Anheften" der Analyte an eine gegebenenfalls entsprechend funktionalisierte Probenträgeroberfläche kann unspezifisch über van der Waalssche und ionische Wechselwirkungen, aber auch über Wasserstoffbrücken-, koordinative oder kovalente Bindungen erfolgen.

Ein weiterer Effekt, der analytisch ausgenutzt werden kann, ist die Konzentrierung von Analyten im Bereich des minimalen Abstandes einer konkaven Oberfläche bezüglich des Bodens des Probenträgers. Eine auf den Analyten abgestimmte Funktionalisierung der Oberfläche oder die Variation der Oberflächeneigenschaften des Probenträgers sind auch hier denkbar. Die Variation des Flüssigkeitsvolumens und damit der Höhe der Flüssigkeitssäule kann hier ebenfalls vorteilhaft ausgewertet werden.

Die lokale Konzentrierung geladener Analyte kann beispielsweise auch durch elektrische Felder erfolgen. Außerdem können durch den Einsatz elektrischer Felder die Eigenschaften der Probenträgeroberflächen, der Flüssigkeiten, Gase und/oder der Analyten

so verändert werden, dass für Messungen vorteilhafte Effekte erzielt werden. Beispielsweise ist es mit Hilfe von Elektroden möglich, durch das Anlegen unterschiedlicher elektrischer Potentiale an einen Proben­träger mit zunächst unpolaren Oberflächen polare Oberflächen zu erzeugen. Die Verwendung von zeitabhängigen elektrischen Potentialen kann für die Untersuchung magnetischer Analyten beziehungsweise Partikel sinnvoll sein. Außerdem besteht durch den Einsatz von Funkenentladungen die Möglichkeit, schnelle Reaktionen zu untersuchen. Entsprechend kann dies auch durch schnelle Druckänderungen mit Hilfe der Zu- und Abflusssysteme ermöglicht werden.

Zudem können unter Verwendung der Zu- und Abflusssysteme Analyten im Fluss in die Kammer verbracht werden. Hierbei kann das Volumen der Flüssigkeiten und/oder Gase konstant gehalten werden. Wird die Konzentration des Analyten einer fließenden Flüssigkeit konstant gehalten, erfolgt eine Bindung des Analyten an die Proben­trägeroberfläche, bis ein dynamisches Gleichgewicht erreicht wird. Aufgrund der einhergehenden Meniskenbildung und Signalveränderung kann die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ermittelt werden. Wird mit Flüssigkeit ohne Analyt gespült, erfolgt die zeitabhängige Dissoziation des Analyten von der Proben­trägeroberfläche. Entsprechend kann die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ermittelt werden. Damit können die Gleichgewichtskonstanten der Assoziation und Dissoziation berechnet werden. Natürlich ist auch hier der Einsatz unterschiedlicher Analytkonzentrationen denk-

bar. Diese können dann anhand des Ausmaßes des Signals bestimmt werden.

Neben Zu- und Abflüssen direkt in die Kammer ist auch der Einsatz von Zu- und Abflüssen 21, 22 in den Probenträger, der in diesem Fall über Hohlräume verfügt, denkbar. Dadurch kann eine Thermostatisierung erfolgen. Außerdem kann über permeable, im Speziellen semipermeable Membraneigenschaften der Probenträgeroberflächen der Seitenwände 3 und des Bodens 4 ein Stoffaustausch stattfinden, der gemessen werden kann.

Die oben beschriebenen Ausführungsformen in Bezug auf die Detektoreinheit, Lichtquelle beziehungsweise Lichtstrahl sowie Beispiele hinsichtlich der Vergleichsmessungen, Phasen- beziehungsweise Flüssigkeiten können prinzipiell beliebig miteinander kombiniert werden.

Der Probenbehälter weist vorzugsweise einen Radius von 2 mm bis 3 mm auf, jedoch sind zuverlässige Ergebnisse auch bei einem Radius von circa 6 mm erzielbar.

Die Bestimmung eines Analyten kann dadurch erfolgen, dass in eine bereits vorhandene Lösung (Figuren 5A oder B) ein geringes Volumen beziehungsweise eine geringe Menge Analyt gegeben wird, wodurch sich dann konkave (Figuren 5C, D oder E) oder konvexe (Figuren 5F bis J) Menisken bilden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Systems (Figuren 7, 8 und 9) ist die Zugabe von geringen Analytmengen möglich. Eine Änderung der Schicht-

dicke hierdurch kann demnach vernachlässigt werden. Außerdem ist die Verwendung von Referenzen (mit gleichem Volumen), wie Lösungen mit bekannten polaren Eigenschaften oder Zusätzen, denkbar. Bei Kinetiken würde die Änderung des Signals mit der Zeit verfolgt werden, bezogen auf den Start- und Endpunkt einer Reaktion oder Bindung.

Abweichungen durch Absorption sind dabei zu berücksichtigen. Allerdings liefert die Meniskenbildung eine charakteristische Signalverteilung bezüglich des Radius' (Figur 5). Dies trifft in dieser Weise auf die Absorption nicht zu. Außerdem wird vorzugsweise angestrebt, nicht die Wellenlängen zur Messung einzusetzen, bei denen der Analyt absorbiert, sondern eine andere, inerte Substanz oder vorzugsweise das Lösungsmittel (IR-Bereich bei Wasser). Es ist denkbar, dass zur Berücksichtigung von Absorptionen eine Absorptionsmessung separat oder statt vertikal horizontal im selben Probenträger durchgeführt werden. Damit kann die Änderung der Absorption unabhängig von der Meniskenbildung erfasst werden.

Entscheidend ist somit das Auftreten von Effekten überhaupt, die Signale ergeben, welche den Nachweis beziehungsweise die Bestimmung von Analyten ermöglichen. Quantifizierungen können beispielsweise über Eichreihen erfolgen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, die Eigenschaften von Flüssigkeiten, im Besonderen deren Oberflächenspannung und Brechungsindices, die Eigenschaften von Feststoffen beziehungsweise Ober-

flächen, im Speziellen deren Grenzflächeneigenschaften, beispielsweise die Polarität und Rauigkeit sowie die Eigenschaften von Gasen zu bestimmen.

5 Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einem Proben­träger, wobei der Analyt gegebenenfalls in und/oder an einem flüssigen oder gasförmigen oder festen Aufnahmemedium enthalten ist unter Vorliegen  
10 mindestens einer Flüssigkeit, **dadurch gekennzeichnet**, dass die geometrische Ausgestaltung einer Grenzfläche der Flüssigkeit zum Nachweis des Analyten im Proben­träger mittels Messung eines von der Gestalt der Grenzfläche abhängigen Messwerts heran­  
15 gezogen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Analyt beziehungsweise die Flüssigkeit mit mindestens einem Lichtstrahl durchsetzt wird und eine von der geometrischen Ausgestaltung  
20 der Grenzfläche abhängige Lichtintensität mittels einer Detektoreinheit zum Nachweis des Analyten im Proben­träger ermittelt wird.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass mittels der De­  
25 tektoreinheit eine photometrische Messung oder eine luminometrische Messung erfolgt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Detektorein­  
30 heit unter Veränderung des Abstands zur Grenzfläche bewegt wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein zwischen der Grenzfläche und der Detektoreinheit angeordnetes optisches Linsensystem zur Messoptimierung bewegt  
5 wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein qualitativer und/oder quantitativer Nachweis des Analyten unter Heranziehung von geeigneten Eichreihen erfolgt.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine den Lichtstrahl emitierende Lichtquelle zur Erhöhung der Messempfindlichkeit bewegt wird.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Messoptimierung der Probenträger und/oder die Flüssigkeit mit einem elektrischen, magnetischen oder elektromagnetischen Feld beaufschlagt werden.
- 20 9. Vorrichtung, insbesondere zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend einen Probenträger (PT) zur Aufnahme eines gegebenenfalls in einem flüssigen, gasförmigen oder festem Aufnahme-medium enthaltenen Analyten unter Vorliegen einer Flüssigkeit mit einer Grenzfläche,  
25 eine Lichtquelle (LQ) zur Abgabe mindestens eines den Analyten beziehungsweise die Flüssigkeit durchsetzenden Lichtstrahls und eine Detektoreinheit (D) zur Ermittlung einer von der geometrischen Ausgestaltung der Grenzfläche abhängigen Lichtintensität.  
30 tät.



10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Detektoreinheit (D) eine gekrümmte Detektoroberfläche aufweist.
- 5 11. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass zwischen Probeneträger (PT) und Detektoreinheit (D) ein Linsensystem (11) vorgesehen ist, das zur Messoptimierung bewegbar ist.
- 10 12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Detektoreinheit (D) in Bezug auf den Probeneträger (PT) mindestens einen frontalen Detektorabschnitt und/oder mindestens einen seitlichen Detektorabschnitt aufweist.
- 15



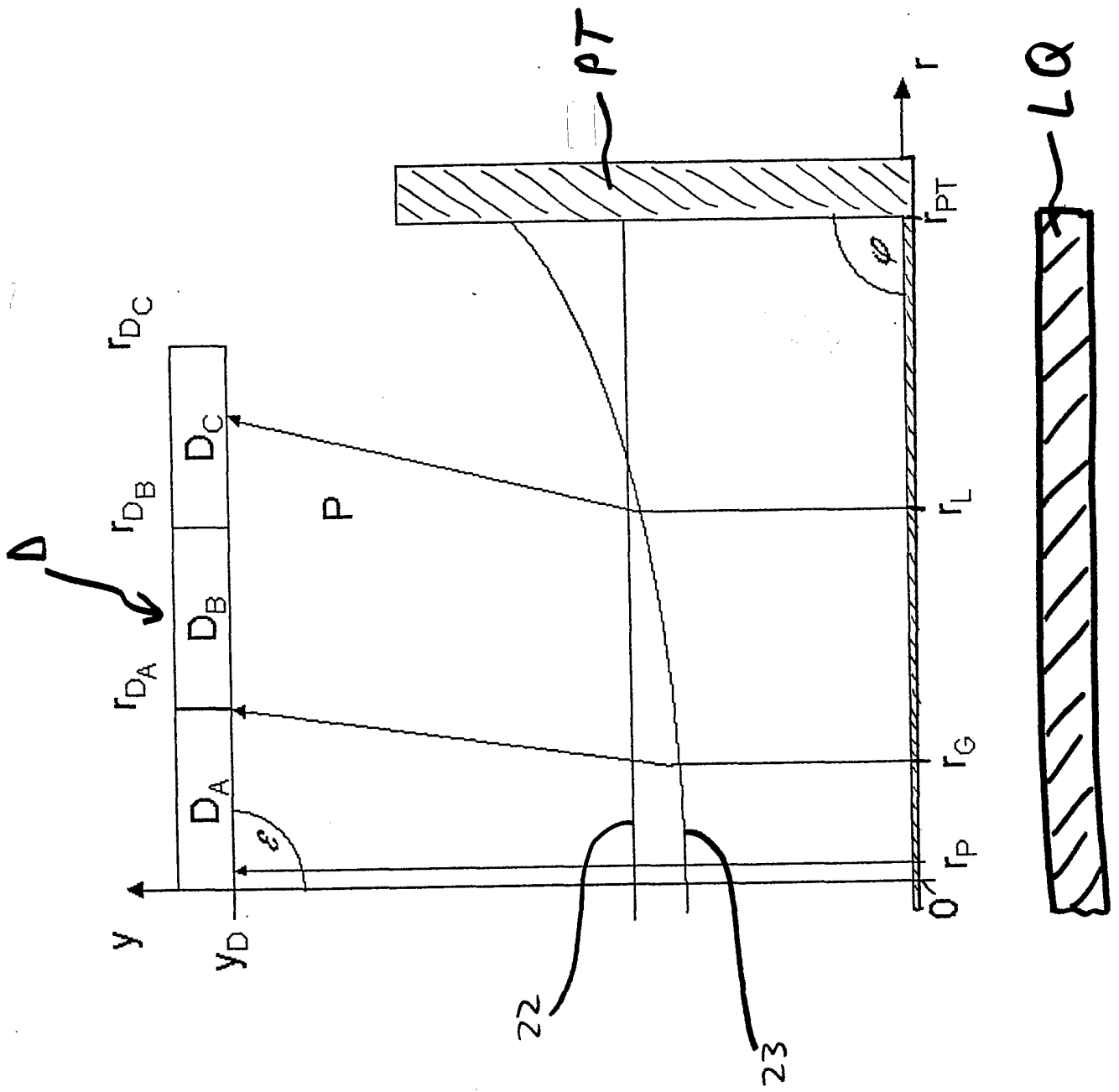


Fig. 1

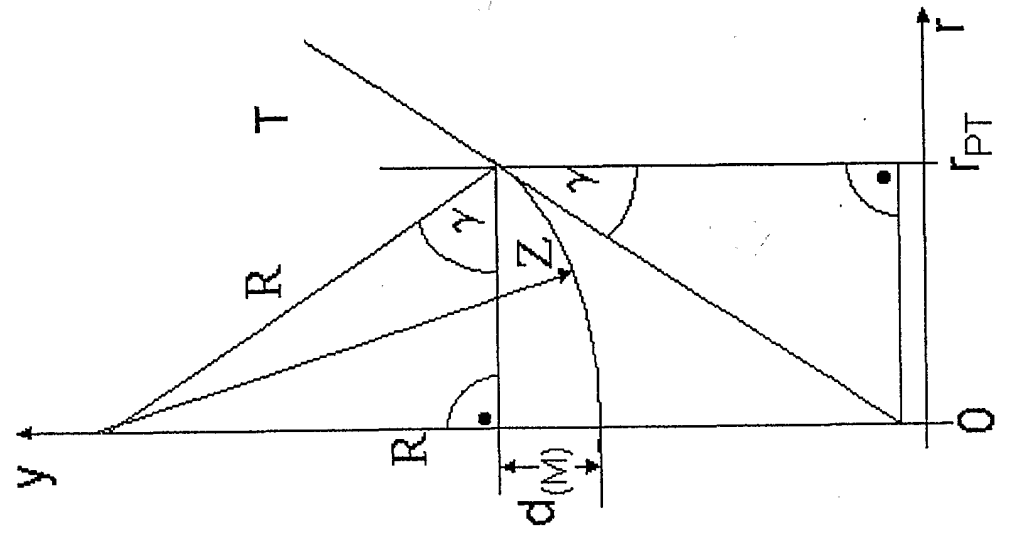


FIG. 2B

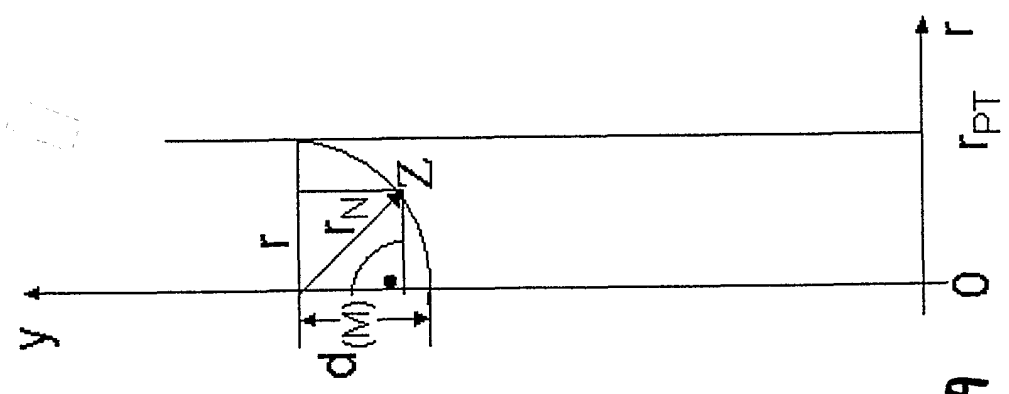


Fig. 2A

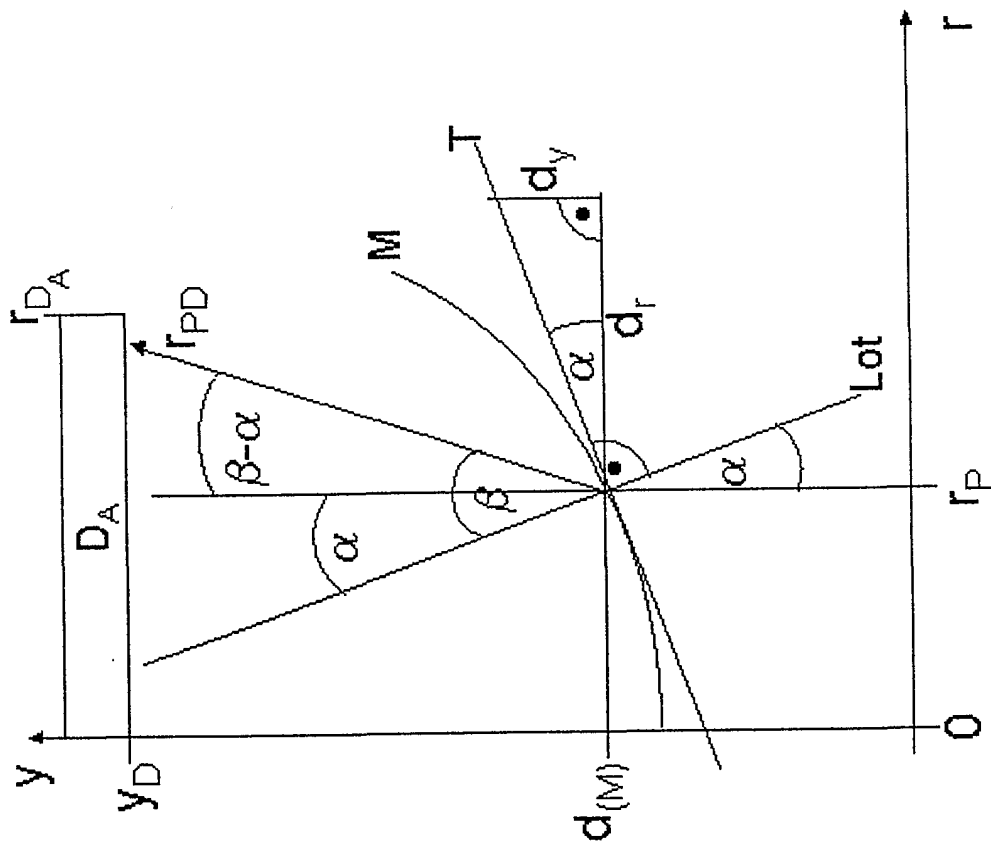


Fig. 3

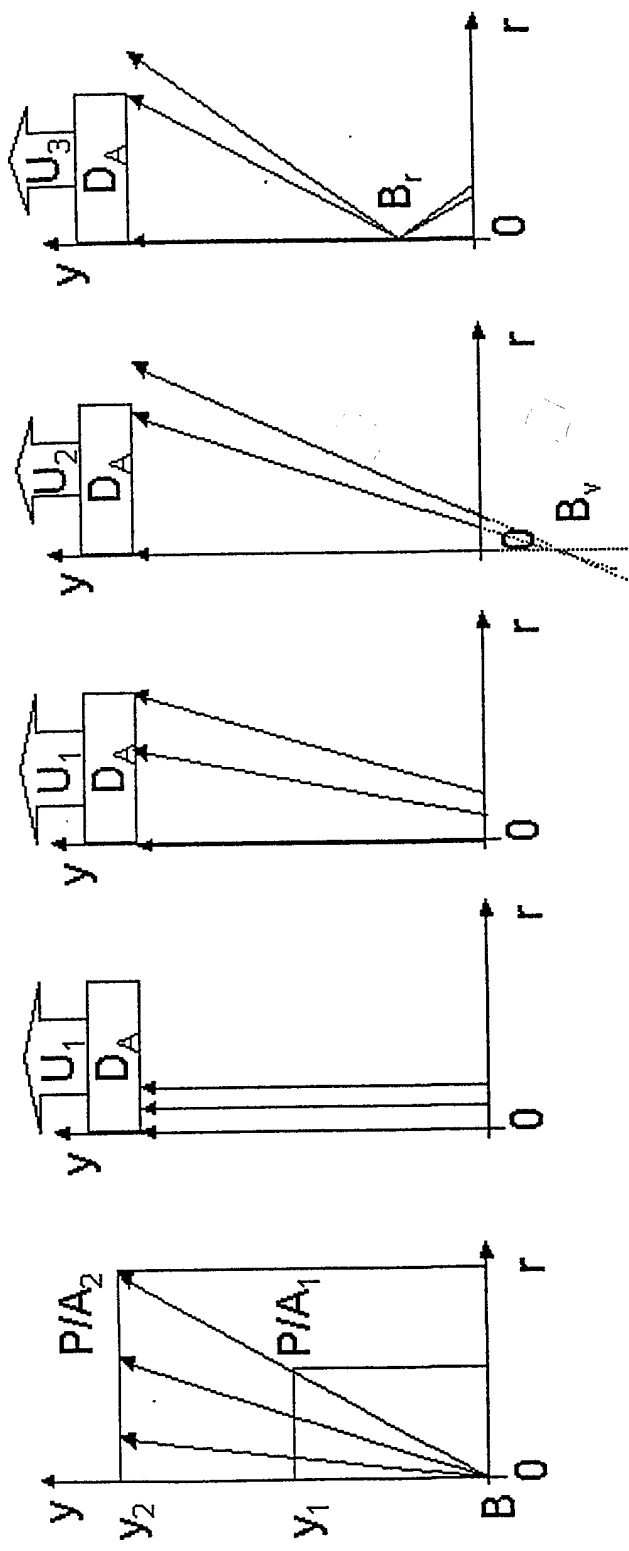


Fig. 4E

Fig. 4D

Fig. 4C

Fig. 4B

Fig. 4A

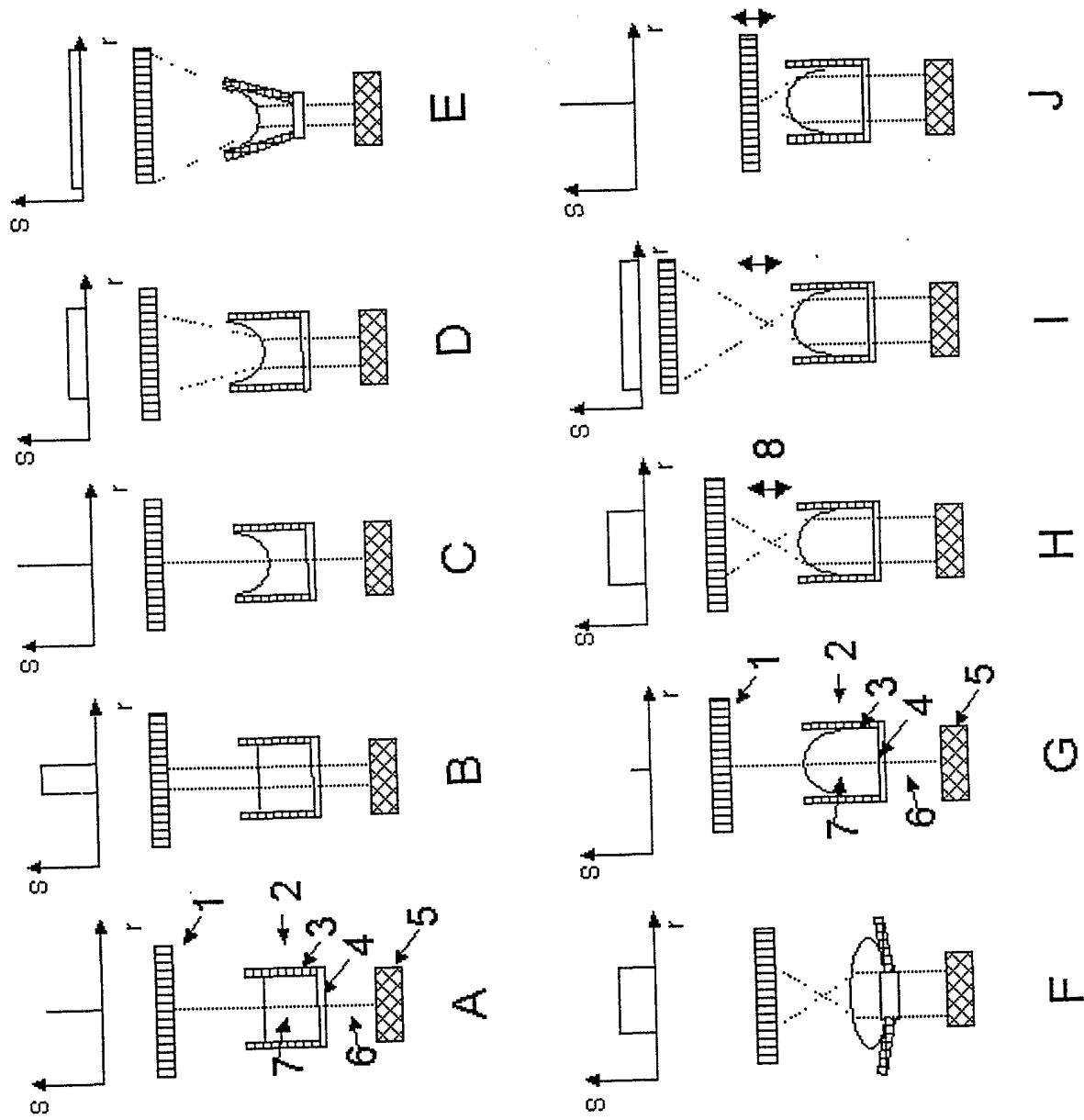


Fig. 5

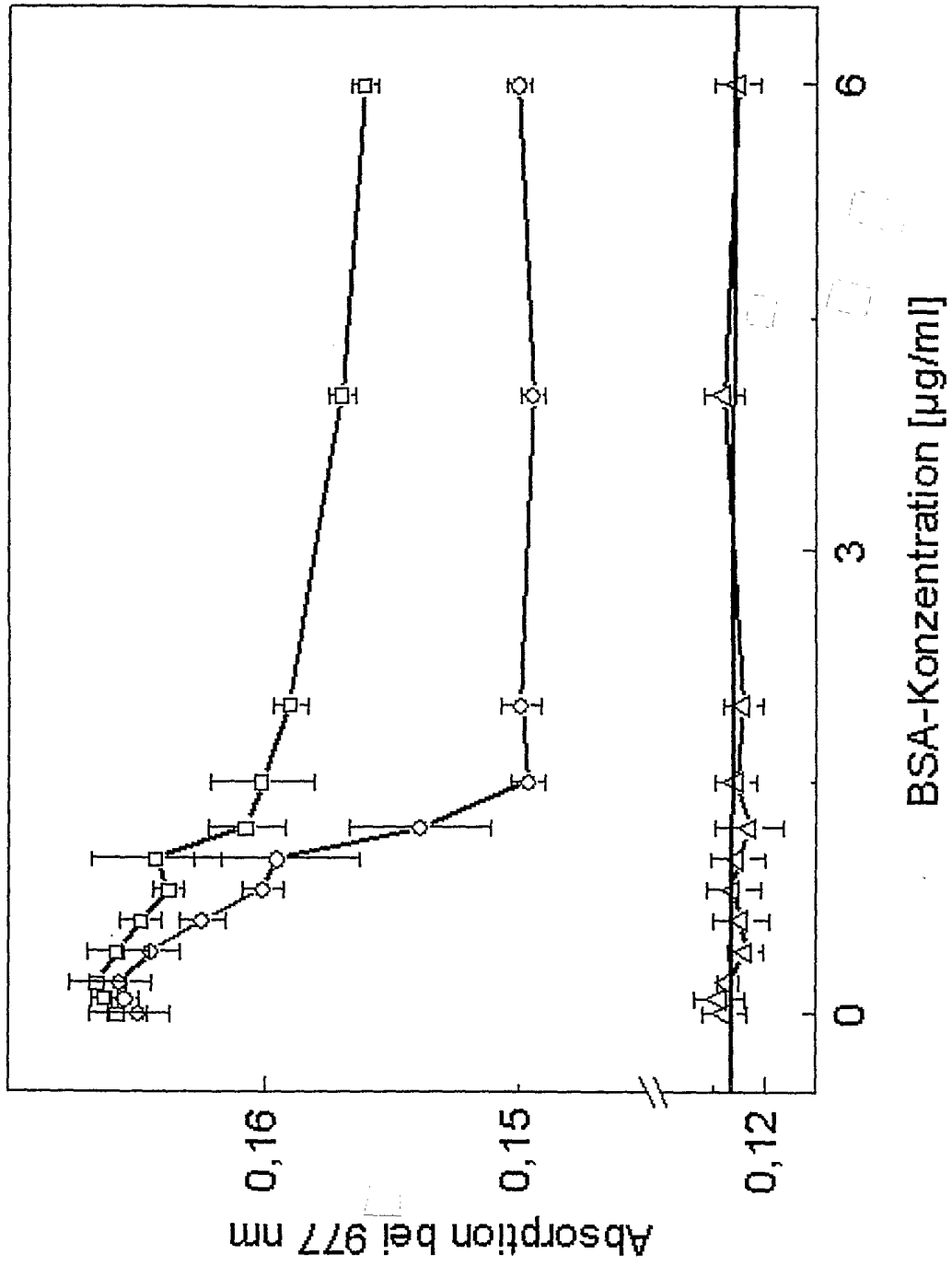


Fig. 6

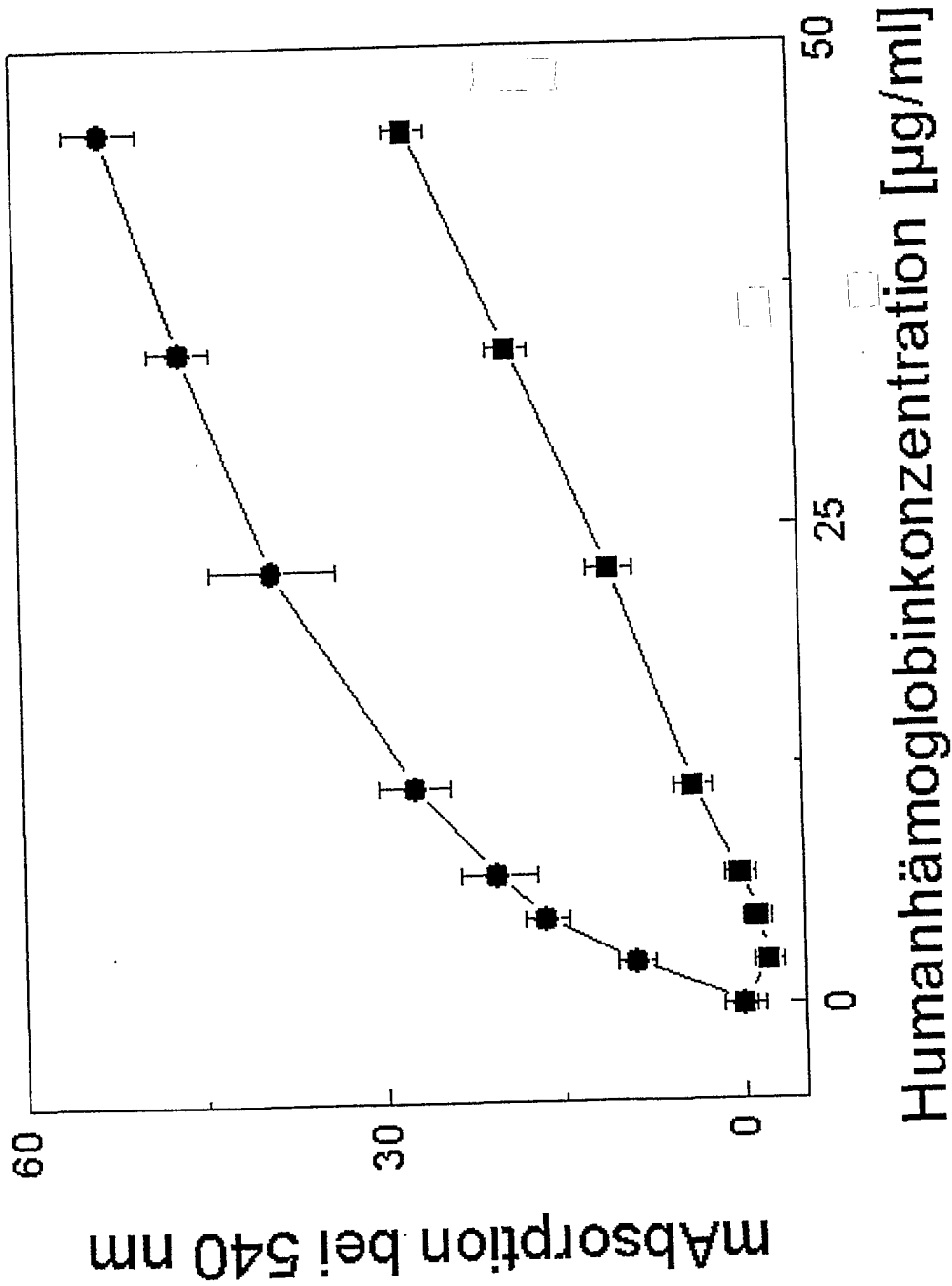


Fig. 7

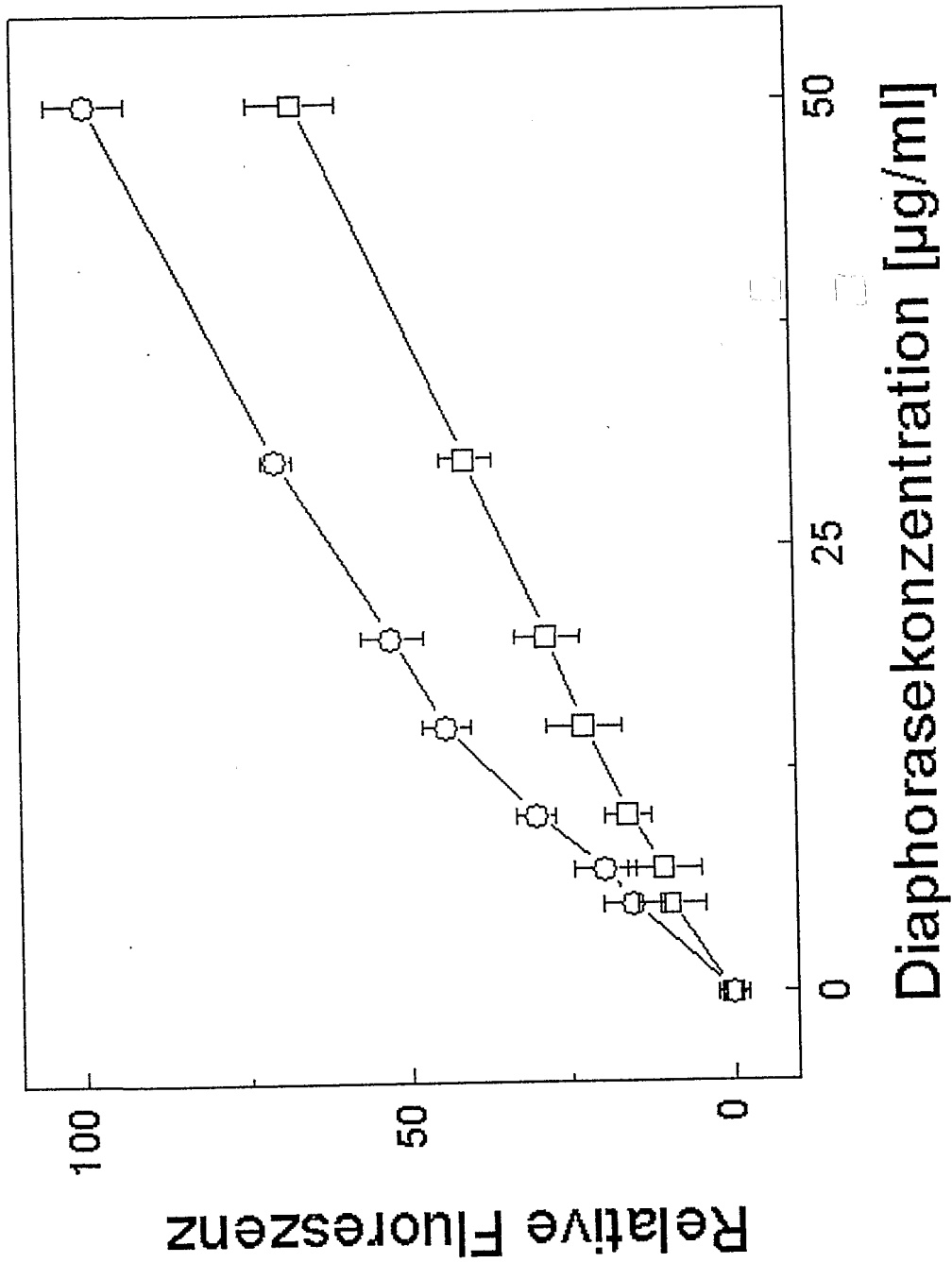


Fig. 8



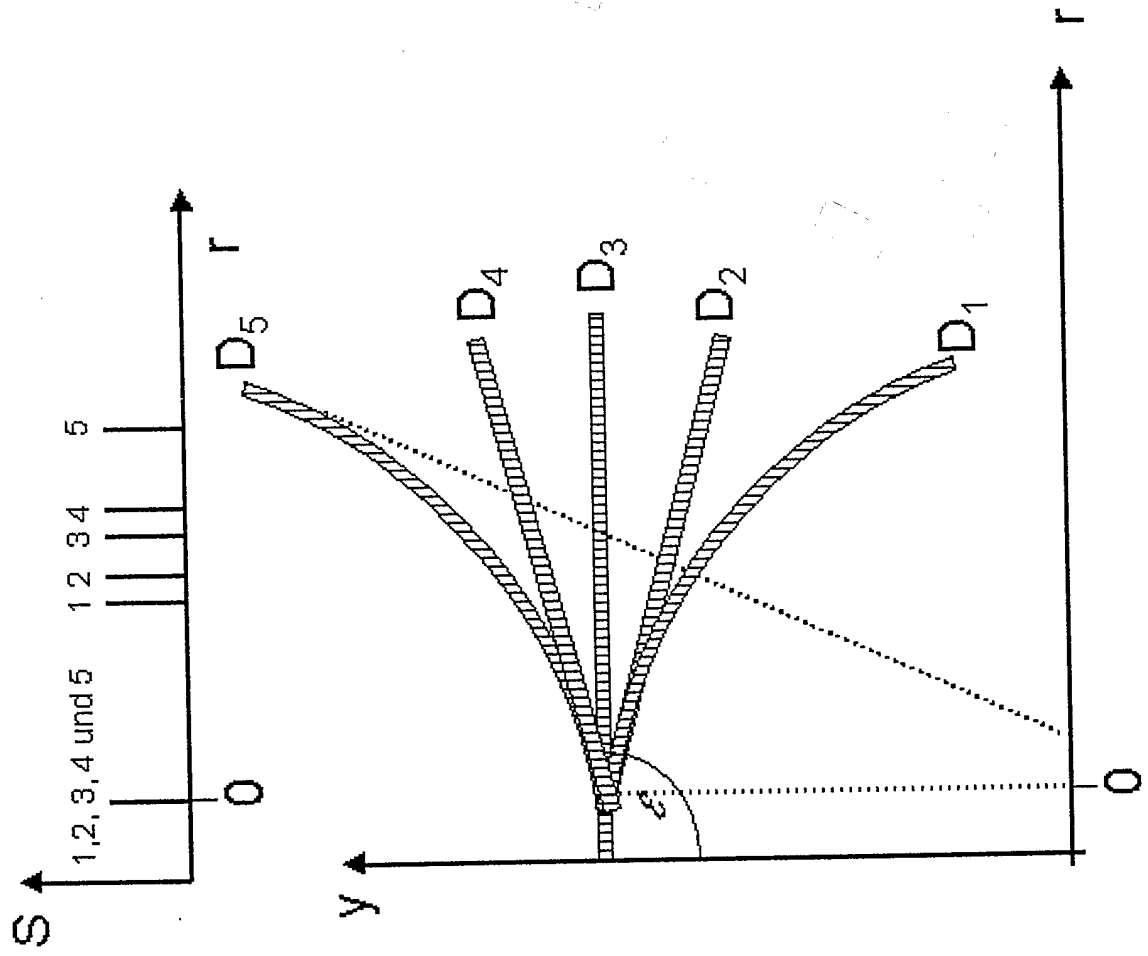


Fig. 9

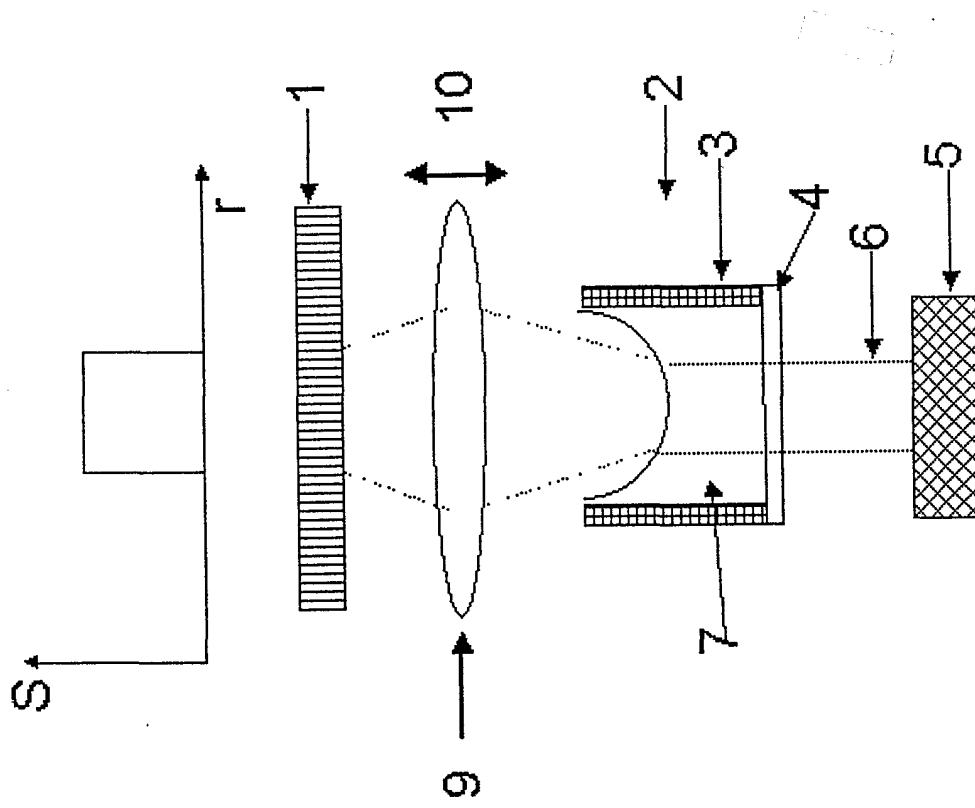


Fig. 10

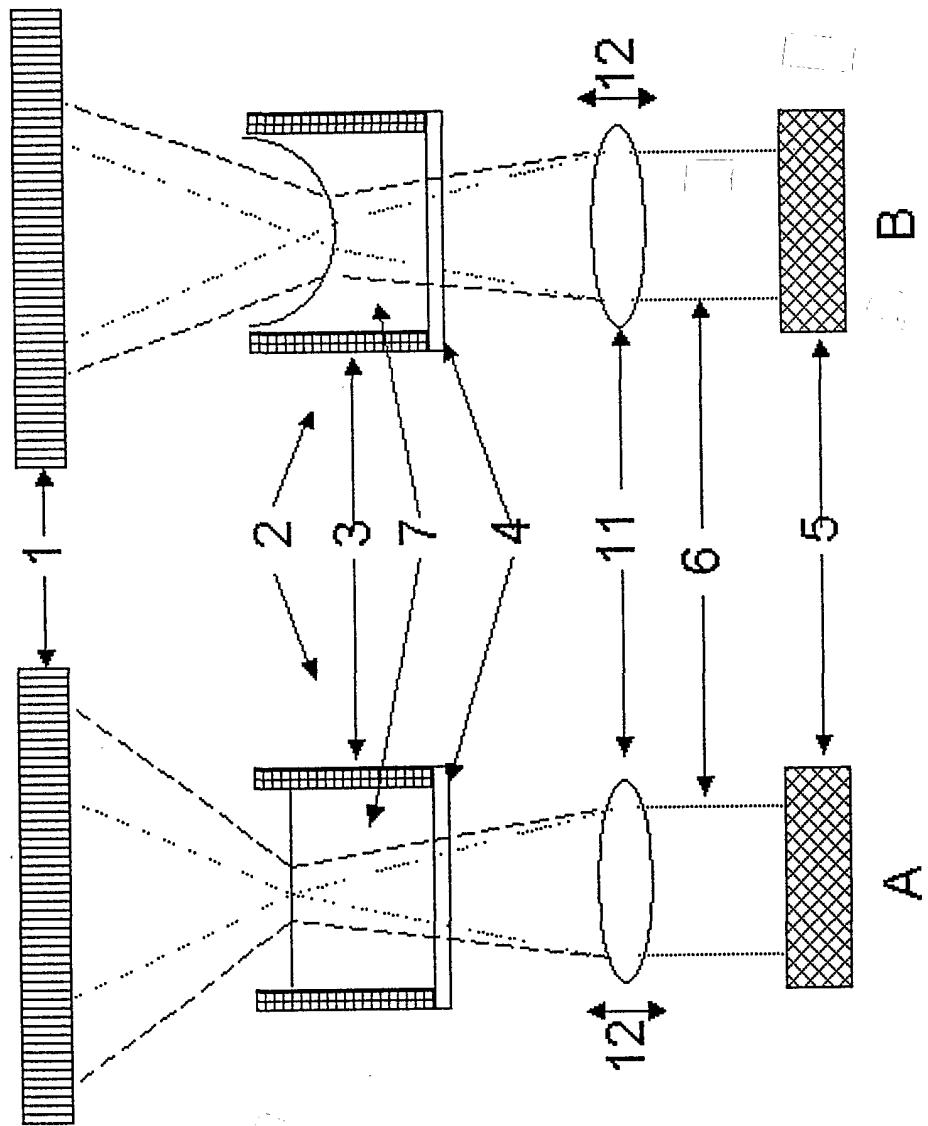


Fig. 11

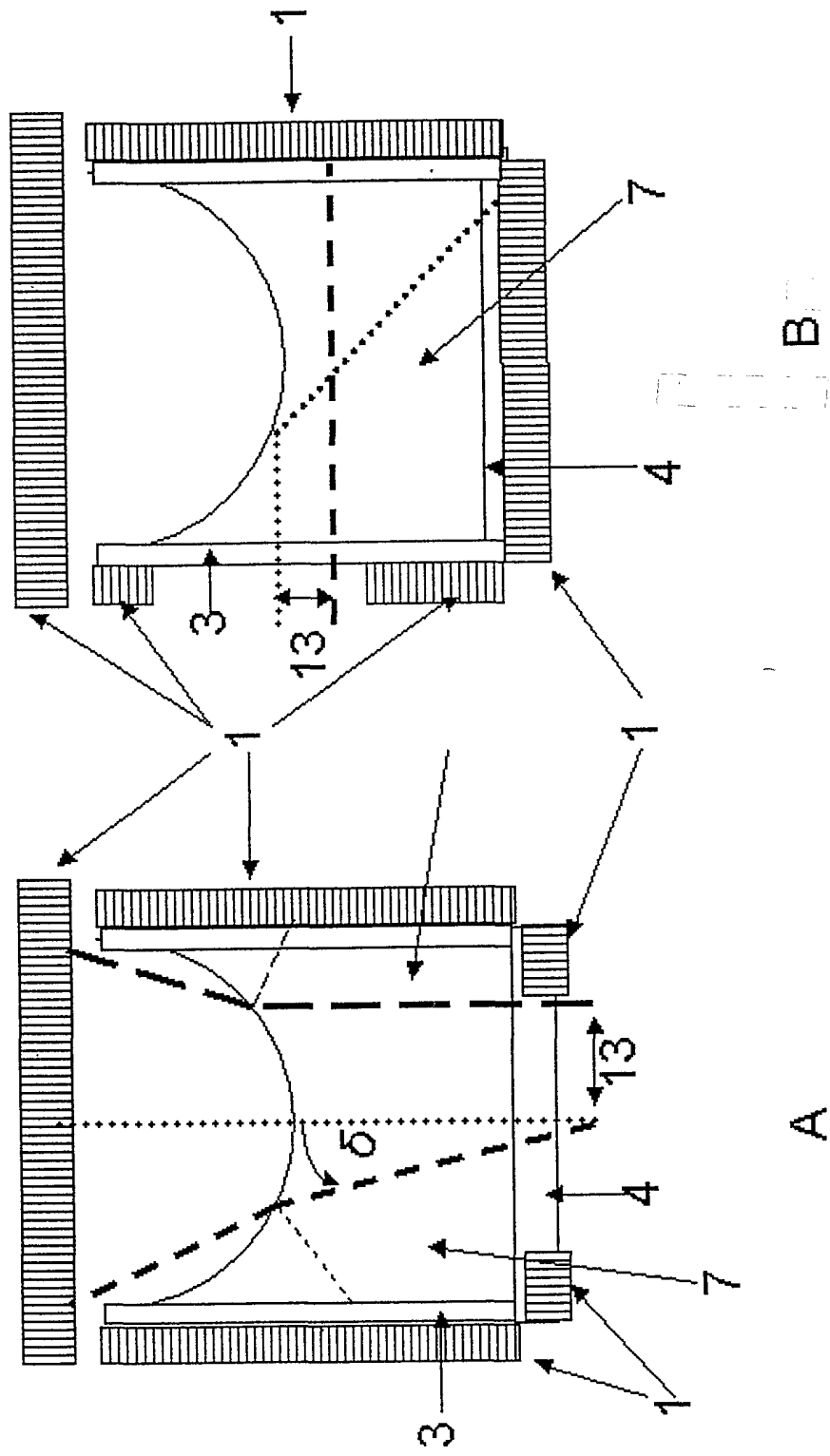


Fig. 12

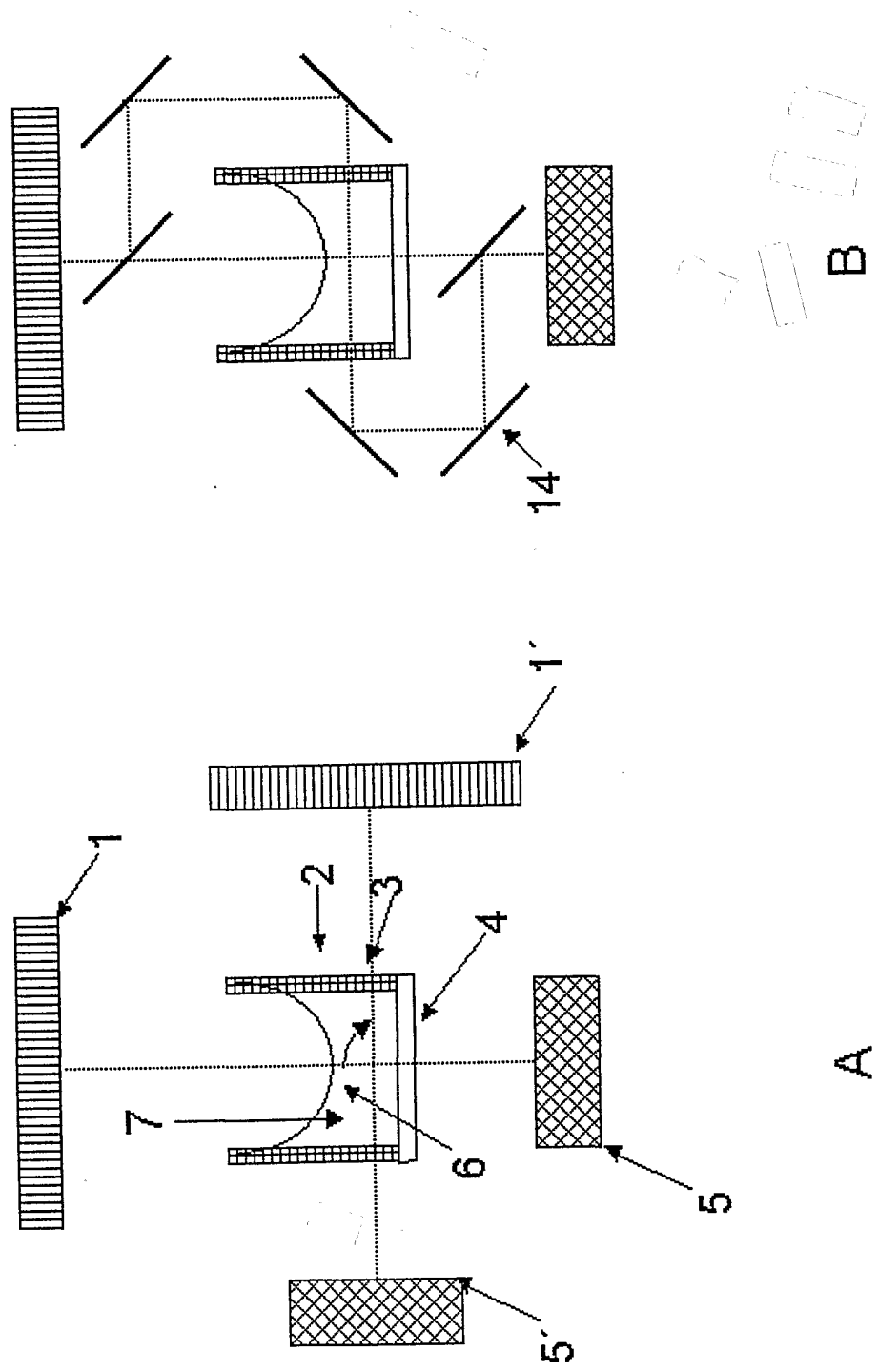


Fig. 13

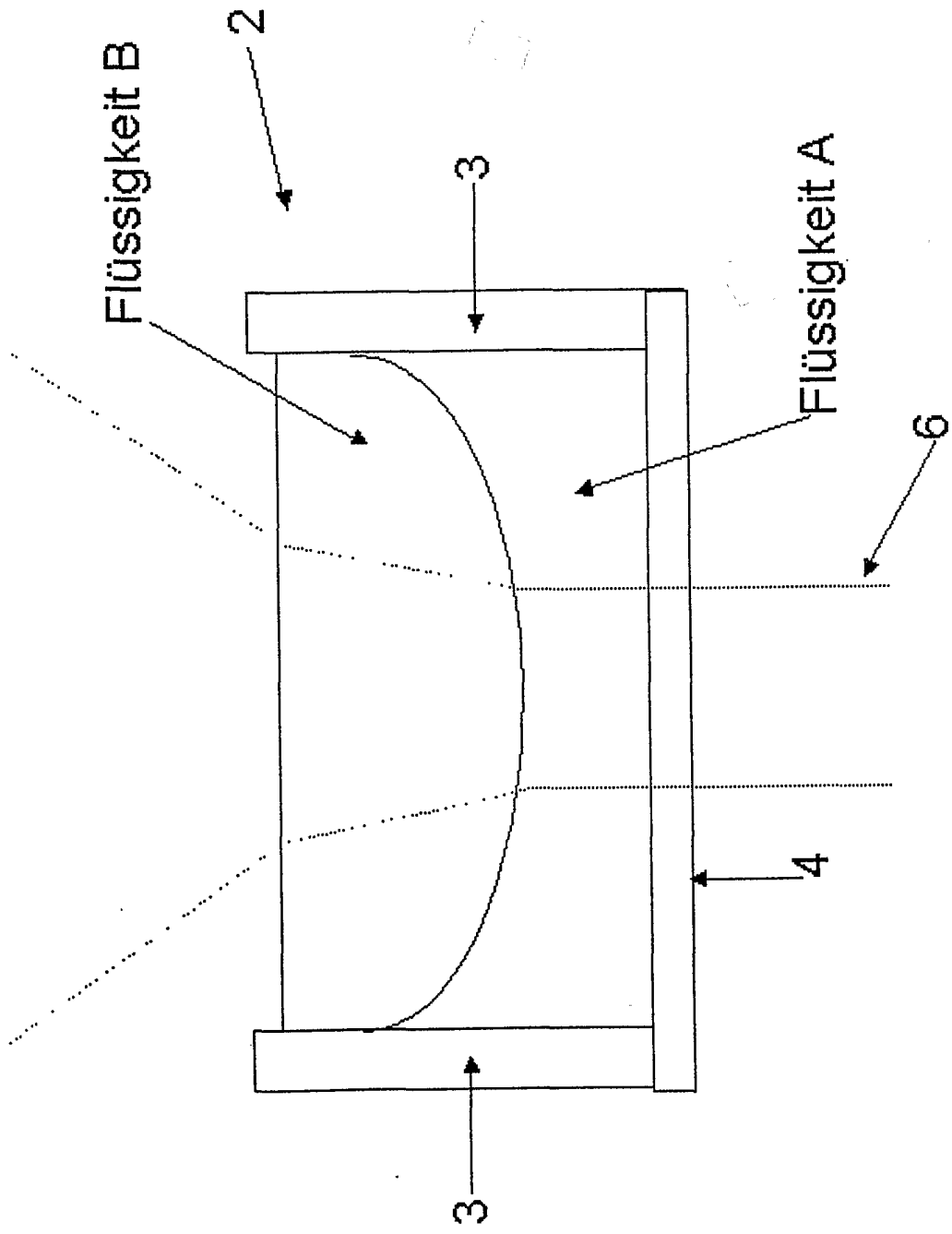


Fig. 14

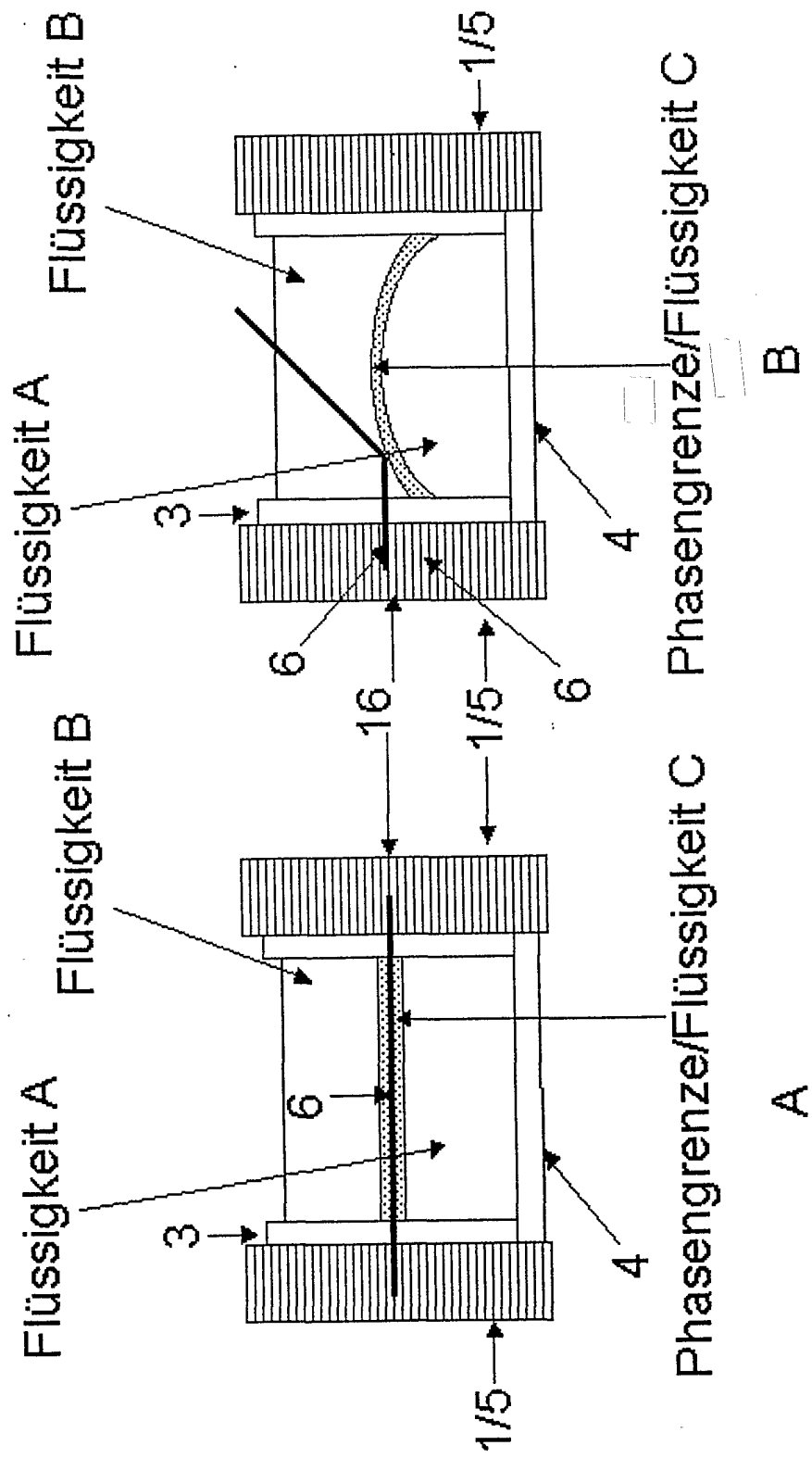


Fig. 15

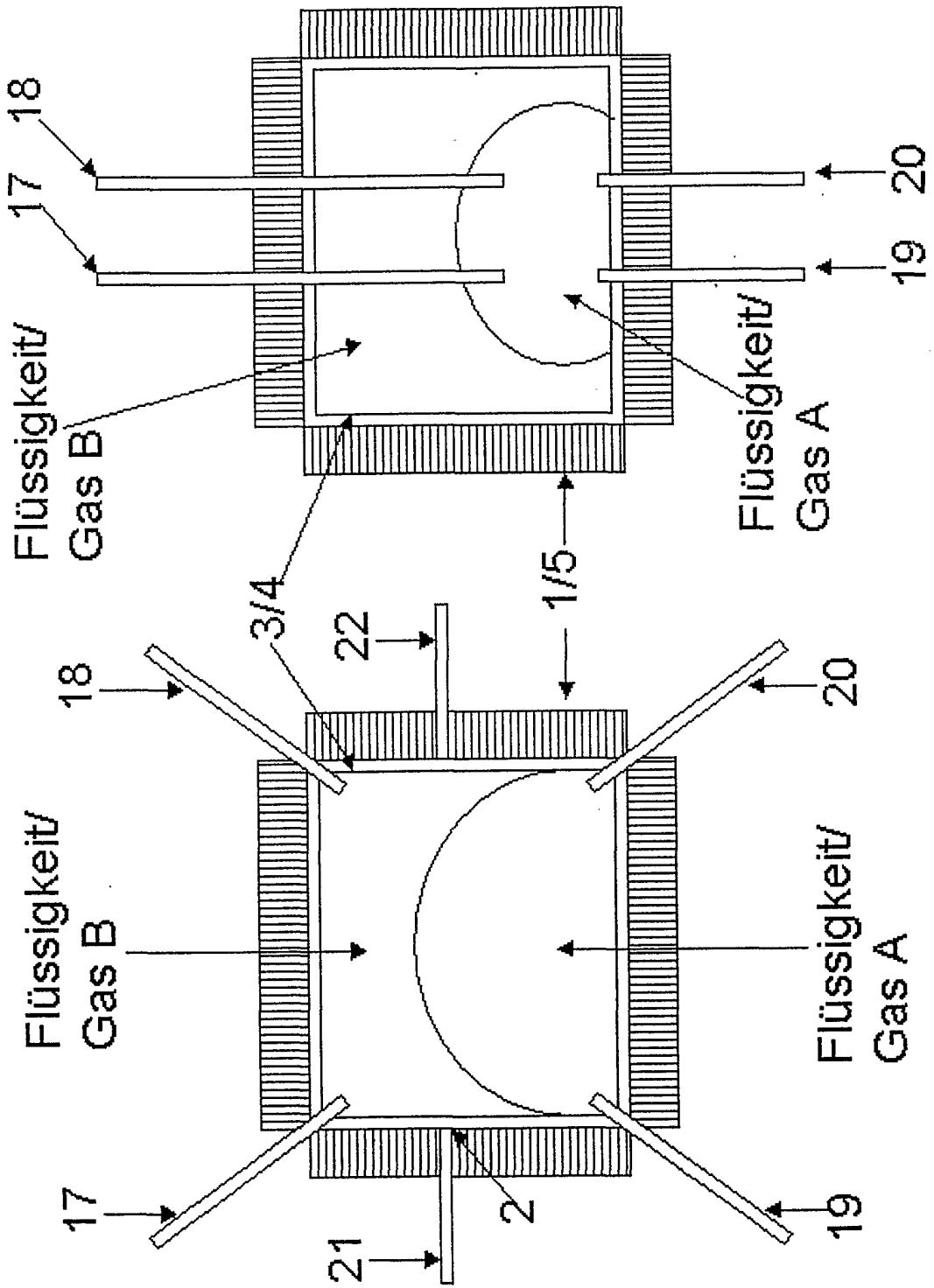


Fig. 16 A

B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10389

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 GOIN13/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 GOIN

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 01 53798 A (ISIS INNOVATION ;VAUX DAVID JOHN (GB); COTTINGHAM MATTHEW (GB)) 26 July 2001 (2001-07-26) page 2, line 7-16 page 5, line 24 -page 8, line 29 figures 1,4	1-3,6,8, 9,12
X	FR 2 619 216 A (ARI SA) 10 February 1989 (1989-02-10) page 3, column 2-19	1,6
X	US 4 730 921 A (KLEIN GERALD L ET AL) 15 March 1988 (1988-03-15) column 5, line 44 -column 6, line 36	9,12
	-/--	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 January 2002

Date of mailing of the international search report

01/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoogen, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10389

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 963 318 A (HELD PAUL G) 5 October 1999 (1999-10-05) column 1, line 30-38 column 2, line 3-18 figure 1  -----	9,12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/10389

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0153798	A	26-07-2001	AU 2384001 A WO 0153798 A1	31-07-2001 26-07-2001
FR 2619216	A	10-02-1989	FR 2619216 A1 WO 8901142 A1	10-02-1989 09-02-1989
US 4730921	A	15-03-1988	CA 1290246 A1 DE 3685936 D1 DE 3685936 T2 EP 0221779 A2 JP 2573933 B2 JP 62175649 A	08-10-1991 13-08-1992 04-03-1993 13-05-1987 22-01-1997 01-08-1987
US 5963318	A	05-10-1999	EP 1101097 A1 WO 0008439 A1	23-05-2001 17-02-2000

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10389

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

IPK 7 G01N13/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 01 53798 A (ISIS INNOVATION ; VAUX DAVID JOHN (GB); COTTINGHAM MATTHEW (GB)) 26. Juli 2001 (2001-07-26) Seite 2, Zeile 7-16 Seite 5, Zeile 24 -Seite 8, Zeile 29 Abbildungen 1,4	1-3,6,8,9,12
X	FR 2 619 216 A (ARI SA) 10. Februar 1989 (1989-02-10) Seite 3, Spalte 2-19	1,6
X	US 4 730 921 A (KLEIN GERALD L ET AL) 15. März 1988 (1988-03-15) Spalte 5, Zeile 44 -Spalte 6, Zeile 36 --- -/--	9,12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Januar 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/02/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoogen, R

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10389

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 963 318 A (HELD PAUL G) 5. Oktober 1999 (1999-10-05) Spalte 1, Zeile 30-38 Spalte 2, Zeile 3-18 Abbildung 1 -----	9,12

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10389

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0153798	A	26-07-2001	AU	2384001 A	31-07-2001
			WO	0153798 A1	26-07-2001
FR 2619216	A	10-02-1989	FR	2619216 A1	10-02-1989
			WO	8901142 A1	09-02-1989
US 4730921	A	15-03-1988	CA	1290246 A1	08-10-1991
			DE	3685936 D1	13-08-1992
			DE	3685936 T2	04-03-1993
			EP	0221779 A2	13-05-1987
			JP	2573933 B2	22-01-1997
			JP	62175649 A	01-08-1987
US 5963318	A	05-10-1999	EP	1101097 A1	23-05-2001
			WO	0008439 A1	17-02-2000