

51

Int. Cl.: G 01 n

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



62

Deutsche Kl.: 42 1, 13/04

10

# Offenlegungsschrift 1815 352

11

21

Aktenzeichen: P 18 15 352.1

22

Anmeldetag: 18. Dezember 1968

43

Offenlegungstag: 14. Januar 1971

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: —

33

Land: —

31

Aktenzeichen: —

64

Bezeichnung: Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Dittrich, Dr. Wolfgang; Göhde, Dr. Wolfgang; 4400 Münster

Vertreter: —

72

Als Erfinder benannt: Erfinder ist der Anmelder

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): —  
Prüfungsantrag gemäß § 28 b PatG ist gestellt

DT 1815352

ORIGINAL INSPECTED

1815352

Anmelder: Prof. Dr. Wolfgang Dittrich  
44 Münster, Am Krug 42  
und Dr. Wolfgang Göhde  
44 Münster, Lohöfenerweg 39

Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen  
einer Dispersion

Die Erfindung betrifft ein automatisches Meß- und Zählgerät zum selektiven Zählen und Messen von Teilchen einer Dispersion im optischen Strahlengang, wobei die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der Teilchen unterschiedlichen physikalischen, physikalisch-chemischen oder chemischen Eigenschaften zugeordnet sein können. Das neue automatische Meß- und Zählgerät bietet gegenüber den bekannten Meß- und Zählgeräten insbesondere in allen jenen Fällen Vorteile, bei denen es darauf ankommt, in einer einzigen Meßreihe an einer sehr großen Anzahl von Teilchen eines Teilchenkollektivs neben ihrer in einem vorgegebenen Volumen des flüssigen oder gasförmigen Dispersionsmittels enthaltenen Gesamtzahl auch die relative Häufigkeit von Teilchen mit bestimmten physikalischen, physikalisch-chemischen oder chemischen Eigenschaften zu ermitteln.

Automatische Teilchen-Meß- und Zählgeräte dienen in Wissenschaft und Technik hauptsächlich dazu, oft sehr kleine Teilchen (z.B. Staubteilchen, Kristalle, Bakterien, Algen, Plankton, Fetttröpfchen usw.) zahlenmäßig zu erfassen und nach

009883/0894

ihrer Größe zu klassifizieren. Im Gegensatz zur direkten, nichtautomatischen oder automatischen Zählung von Teilchen im mikroskopischen Präparat gestattet ein automatisches Meß- und Zählverfahren im Durchfluß rasche und genaue Bestimmungen der Anzahl und unter bestimmten Voraussetzungen auch der relativen Größe von Teilchen, die in einem vorgegebenen Volumen des flüssigen oder gasförmigen Dispersionsmittels enthalten sind. Die hier beschriebene Erfindung gestattet es nun, neben der Teilchengröße auch andere Eigenschaften der Teilchen zu ihrer Klassifizierung heranzuziehen. Insbesondere ist daran gedacht, mit Hilfe bestimmter Ausgestaltungen der Erfindung 1. submikroskopische Teilchen aufgrund des Tyndall-Effektes automatisch zu zählen und 2. an großen Kollektiven die Häufigkeitsverteilungen der Teilchen aufgrund ihres Gehaltes an verschiedenen Inhaltsstoffen z.B. Chlorophyll, Nukleinsäuren, Protein und an anderen Licht bestimmter Wellenlängen absorbierenden oder fluoreszierenden Stoffen, sei es ohne, sei es nach Anfärbung mit absorbierenden oder fluoreszierenden Farbstoffen, rasch und sicher zu ermitteln.

Es gibt bereits automatische Durchfluß-Meß- und Zählgeräte, mit denen es möglich ist, neben der Teilchenzahl die Größe der Teilchen eines Kollektivs zumindest näherungsweise zu ermitteln (DBP Nr. 964 810). Dabei wird davon ausgegangen, daß Teilchen einer Dispersion beim Passieren einer Verengung, an der eine Gleichspannung anliegt, Widerstandsänderungen induzieren, die als elektrische Impulse verstärkt und gezählt werden können. Diese Widerstandsänderungen nehmen u.a. mit

der Größe der Teilchen zu. Dadurch werden an großen Teilchenkollektiven Größenanalysen möglich.

Ein automatisches Meß- und Zählverfahren, das darauf beruht, daß in Elektrolytlösung suspendierte Teilchen beim Passieren einer Durchtrittsstelle, die als elektrisch leitende Verbindung zwischen zwei mit einer Elektrolytlösung gefüllten Gefäßen ausgeführt ist, Widerstandsänderungen induzieren, erlaubt bei gleicher spezifischer innerer Leitfähigkeit ausschließlich eine Klassifizierung der Teilchen nach ihrer Größe. Diese Methode zur Bestimmung der Teilchengröße ergibt im allgemeinen nur unsichere Werte, da die Größe der Widerstandsänderung außer vom Teilchenvolumen auch von der inneren Leitfähigkeit der Teilchen abhängt. Dieses Durchflußverfahren erfaßt daher neben Volumen und der inneren Leitfähigkeit keine weiteren Eigenschaften der Teilchen, die zu ihrer Klassifizierung, bzw. näheren Beschreibung dienen könnten.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein automatisch arbeitendes Gerät zu finden, mit dessen Hilfe es möglich ist, neben der Bestimmung der gesamten Teilchenzahl und der Größenverteilung der Teilchen in einem vorgegebenen Volumen eines flüssigen oder gasförmigen Dispersionsmediums eine Klassifizierung aufgrund anderer unterschiedlicher physikalischer, physikalisch-chemischer oder chemischer Eigenschaften zu ermöglichen. Aufgabe der Erfindung ist es zudem, die langwierige Klassifizierung von Teilchen aufgrund der mikroskopischen oder mikrospektralphotometrischen Analyse einer größeren Anzahl von Einzelteilchen in Zählkammern oder mikroskopischen

Präparaten (z.B. mit Hilfe des Universal-Mikro-Spektralphoto-  
meters UMSP I der Firma Zeiss) durch ein automatisch regist-  
rierendes Durchflußgerät zu ersetzen, bei dem innerhalb sehr  
kurzer Zeit sehr viele Einzelteilchen gemessen und registriert  
werden. Es ist daran gedacht, durch verschiedene Ausführungen  
die Anwendungsbreite der neuen Vorrichtung auf sehr verschie-  
dene Meßkriterien auszudehnen: z.B. auf die Absorptionseigen-  
schaften, die Lichtbrechung der Teilchen bei verschiedenen  
Wellenlängen, die von ihnen verursachte Lichtstreuung bei  
Anwendung der Dunkelfeldbeleuchtung und auf die Intensität  
des Fluoreszenzlichtes nach Fluorochromierung der Teilchen  
mit bestimmten fluoreszierenden oder phosphoreszierenden  
Farbstoffen. Im letzten Fall ist daran gedacht, die Mengen  
eines einzigen oder mehrerer gleichzeitig in einem bestimmten  
Teilchen vorhandenen Inhaltsstoffe zu ermitteln.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die zu  
zählenden und zu messenden Teilchen mit ihrem Dispersions-  
medium annähernd in Richtung der optischen Achse eines Mikro-  
skopes mit großer Geschwindigkeit durch eine im Mikroskop  
scharf eingestellte Düsenöffnung bewegt werden und zwar ver-  
möge einer zu beiden Seiten der Düse bestehenden mechanischen  
Druckdifferenz. Es ist dabei wesentlich, daß die Düsenöffnung  
und die dort befindlichen Teilchen gleichmäßig beleuchtet  
werden, und daß sich jedes Teilchen dabei zwangsläufig genau  
ein einziges Mal in der gleichmäßig beleuchteten "Einstell-  
ebene" des Mikroskopes befindet. Dies wäre z.B. nicht gegeben,  
wenn die Teilchen mit ihrem Dispersionsmedium quer zur

Beobachtungsrichtung des Mikroskopes z.B. durch eine Kapillarröhre bewegt würden, die sich nur teilweise in der Einstellebene des Mikroskopes befindet. Diese Schwierigkeit ließe sich zwar mit Mikroskopobjektiven großer Tiefenschärfe beheben. Es müßte aber damit ein erheblicher Verlust an Empfindlichkeit in Kauf genommen werden, da Objektive mit sehr hoher numerischer Apertur nicht mehr verwendbar wären. Werden dagegen die Teilchen annähernd parallel zur optischen Achse des Mikroskopes durch eine kleine Düsenöffnung hindurchbewegt, dann ist jedes Teilchen zu irgendeinem Zeitpunkt, jedoch nur ein einziges Mal, optimal optisch abgebildet und kann bei gleichmäßiger Ausleuchtung der Düsenöffnung zu diesem Zeitpunkt ein für das individuelle Teilchen charakteristisches optisches Signal liefern. Aufgrund der Änderungen des Lichtstromes beim Durchtritt der Teilchen durch die im Mikroskop scharf eingestellte und gleichmäßig ausgeleuchtete Düsenöffnung läßt sich nicht nur die Partikelzahl in einem vorgegebenen Volumen des Dispersionsmediums bestimmen. Es ist vielmehr auch möglich, z.B. die Größe der Teilchen mit und ohne Verwendung einer Phasenkontrastoptik im "Hellfeldverfahren" zu ermitteln, jedoch nur, wenn die Änderung des Lichtstromes in bekannter Weise von der Teilchengröße abhängt. Größenbestimmungen sind auch im "Dunkelfeldverfahren" möglich. Jedes Teilchen wirft in Abhängigkeit von seiner Größe mehr oder weniger viel Streulicht auf den lichtempfindlichen Empfänger (z.B. auf einen Photomultiplier). Die optischen Eigenschaften der Teilchen lassen sich dazu benutzen, um Aufschlüsse über

andere physikalische, physikalisch-chemische und chemische Eigenschaften zu gewinnen, die mit den optischen (z.B. Absorption für verschiedene Wellenlängen, Lichtbrechung, Fluoreszenz- und Phosphoreszenzerregbarkeit der Teilchen bzw. ihrer Inhaltsstoffe) in bekannter Weise zusammenhängen.

Insbesondere beim Passieren der Düsenöffnung, die in der Einstellebene des Mikroskopes gelegen ist, wird immer der gleiche Raumwinkel des Fluoreszenz- bzw. Phosphoreszenzlichtes als Meßsignal benutzt, sodaß die Teilchen bei gleichzeitiger scharfer Abbildung der Leuchtfeldblende auf die Düsenöffnung aufgrund der maximalen Amplitude ihres Fluoreszenz- bzw. Phosphoreszenzsignals klassifiziert werden können. Das gilt für Teilchen, die von vornherein fluoreszierende oder phosphoreszierende Substanzen enthalten oder die sich mit fluoreszierenden Farbstoffen anfärben lassen.

Die von jedem Teilchen bei seinem Durchtritt durch die Düsenöffnung induzierte Änderung des Lichtstromes, im Sinne einer Abnahme oder einer Zunahme, wird mit Hilfe eines Mikroskopes und eines Photomultipliers in einen elektrischen Impuls umgewandelt, der über geeignete Verstärker- und Registriereinrichtungen erfaßt wird. Dabei kann die Teilchendichte der Dispersion so niedrig bemessen werden, daß eine gleichzeitige Registrierung mehrerer Teilchen weitgehend vermieden wird. Nach Durchlauf des vorgegebenen Meßvolumens durch die Düse der Durchflußkammer kann im einfachsten Fall mit Hilfe eines Vielkanalanalysators sowohl die Gesamtzahl als auch die

Größenverteilung der registrierten Impulse erhalten werden und damit auch eine Häufigkeitsverteilung der durch die jeweilige Impulshöhe charakterisierbaren Teilchen. Behelfsmäßig lassen sich Häufigkeitsverteilungen auch unter Verwendung einer variablen elektronischen Diskriminatorschwelle erhalten.

Für jedes spezielle Meßproblem lassen sich Abwandlungen dieses Meß- und Zählprinzips entwickeln. Fluoreszierende bzw. phosphoreszierende Teilchen lassen sich im Hellfeld zählen; Größenbestimmungen sind hier in einfacher Weise möglich, wenn die Fluoreszenzintensität den Teilchengrößen proportional ist. Mikrochemische Untersuchungen an Teilchen einer Suspension oder Emulsion sind dann möglich, wenn sich bestimmte Anteile der Teilchen fluorochromieren und damit selektiv zur Fluoreszenz oder Phosphoreszenz anregen lassen.

Alle diese selektiven Meß- und Zählverfahren setzen eine gleichmäßige Beleuchtung der in der Objektebene des Mikroskopes scharf abgebildeten Düsenöffnung und der die Öffnung passierenden Teilchen voraus. Zur Vermeidung störender Einflüsse - insbesondere bei Anwendung des Hellfeldprinzips - ist es erforderlich, die Leuchtfeldblende in der mikroskopischen Anordnung nach dem "Köhler'schen Beleuchtungsprinzip" so in der Objektebene abzubilden, daß ihr Bild etwa die Größe der Düsenöffnung hat und sich mit der Düsenöffnung deckt. Die Beleuchtungsdichte hat dann ihr Maximum in der Objektebene des Mikroskopes.

Sollen Partikel nur gezählt werden, so eignet sich besonders das in der Mikroskopie angewendete Dunkelfeldprinzip; insbe-



sondere für Teilchen in der Größenordnung des sichtbaren Lichtes, die aufgrund von Tyndall-Streuung beim Durchtritt durch die Düsenöffnung Lichtimpulse auslösen, die über das Mikroskop zum Photomultiplier gelangen, ist das Dunkelfeldprinzip geeignet. Ist die Abhängigkeit der Streulichtintensität im Dunkelfeld von der Teilchengröße bekannt, dann eignet sich das Verfahren auch für Größenmessungen.

Enthalten die Teilchen der Dispersion nebeneinander zwei oder mehrere fluoreszierende Substanzen mit unterschiedlichem Fluoreszenzspektrum, dann kann das Fluoreszenzlicht über optische Teilerscheiben gleichzeitig auf zwei oder mehrere Photomultiplier geleitet werden, die durch vorgesezte Lichtfilter nur für das Fluoreszenzlicht jeweils einer einzigen fluoreszierenden Substanz empfindlich gemacht worden sind. Die Registrierung der von den beiden bzw. mehreren Photomultipliern abgehenden elektrischen Impulse erfolgt dann über einen zwei- oder mehrparametrischen Impulshöhenanalysator.

In Fig. 1 und Fig. 2 ist ein Ausführungsbeispiel dargestellt, das im Folgenden näher beschrieben wird. Fig. 1 zeigt einen schematischen Überblick über die Vorrichtung, die zur Auswertung der Intensität von Fluoreszenzerscheinungen an den Teilchen einer Dispersion geeignet ist und Fig. 2 einen Querschnitt der für das Meß- und Zählverfahren erforderlichen Durchströmungskammer mit Düse.

Licht der konstanten Lichtquelle (1) fällt über den Kollektor (2), ein Erregerfilter (3), eine variable Leuchtfeldblende (4)

und einen Kondensator (5) auf die Durchströmungskammer (6). Die Objektebene befindet sich an der Stelle der größten Verengung der Durchströmungskammer nämlich an der Düsenöffnung (7). Die Leuchtfeldblende wird auf die in der Objektebene des Mikroskopes befindliche Düsenöffnung scharf abgebildet, sodaß sie gleichmäßig ausgeleuchtet ist. Das von den die Düsenöffnung passierenden Teilchen emittierte Fluoreszenzlicht gelangt über das Mikroskop (8) und das Erregerlichtsperrfilter (9) auf den Photomultiplier (10). Die diskreten Fluoreszenzlichtsignale, die von den die Düsenöffnung passierenden Teilchen ausgehen, induzieren Photostromimpulse, die mittels geeigneter Anordnungen verstärkt (11), gezählt (12) und visuell über ein Braun'sches Rohr (13) kontrolliert werden können. Mit Hilfe eines Impulshöhenanalysators (14) können die Häufigkeitsverteilungen der in Größenklassen eingeteilten Einzelimpulse ermittelt werden. In den Fällen, in denen die Teilchendichte von vorrangiger Bedeutung ist, wird durch ein Manometersystem, eine Saugkolbenvorrichtung oder andere direkte oder indirekte volumetrische Einrichtungen (Ratemeter bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit) dafür Sorge getragen, daß auch die Teilchenzahl pro Volumeneinheit des Dispersionsmediums registriert wird.

An die in Fig. 2 dargestellte Durchströmungskammer (6) mit Düse (7) werden besondere Anforderungen gestellt. Zur Durchführung des Köhler'schen Beleuchtungsprinzips und zur Erreichung der nötigen hohen Lichtdichte in der Objektebene muß sich der Durchströmungskanal in Richtung auf die Düsenöffnung hin

konisch verjüngen (15). Damit sich die Teilchen möglichst kurzzeitig in dem durch die in die Objektebene projizierten Leuchtfeldblende (4) ausgeblendeten Meßbereich befinden, der sich mit der Düsenöffnung genau deckt, ist es erforderlich, daß die Teilchen durch einen sehr flachen Kanal (16) an die Düse (7) herangeführt und durch einen ebenfalls sehr flachen Kanal (17) wieder weggeführt werden. Der Durchmesser der kreisrunden Düsenöffnung kann je nach der Größe der zu messenden und zu zählenden Teilchen zwischen einigen und einigen hundert Mikrometern variiert werden. Der Abstand zwischen der Bodenplatte (18) und der Deckplatte (19), die beide planparallel und für das verwendete Licht durchlässig sein müssen, sollte möglichst klein sein, damit das durch die Düse (7) vorgegebene Meßvolumen zur Vermeidung von Teilchenkoinzidenzen klein ist.

Es ist möglich, Durchflußkapillaren dieser Art aus Glas herzustellen, bei denen der Abstand zwischen der Bodenplatte (18) und der Deckplatte (19), die beide mit der Düsenplatte (20) bei (21) verklebt sind, etwa 100 Mikrometer beträgt. Es ist weiterhin möglich, Durchflußkammern herzustellen, bei denen die Düsenplatte (20) aus korrosionsfestem Metall besteht; eine Düsenplatte aus Metall wirkt dabei gleichzeitig als ideale Blende in der Objektebene. Die Höhe der gesamten Durchströmungskammer soll nicht viel größer sein als 1 mm, damit bei Anwendung des Köhler'schen Beleuchtungsprinzips und mit Öl-immersion gearbeitet werden kann.

Im Unterschied zu anderen automatischen Meß- und Zählgeräten

bietet die Erfindung den Vorteil, daß mit ihrer Hilfe genaue Messungen optischer Eigenschaften von Teilchen in Dispersionen ausgeführt werden können. So ist es z.B. mit Hilfe der Erfindung erstmalig möglich, nach Fluoreszenzanregung genaue Mengenbestimmungen von bestimmten Inhaltsstoffen an sehr großen Teilchenkollektiven automatisch und mit großer Schnelligkeit durchführen zu können. Der den Photomultiplier treffende Lichtimpuls erreicht jeweils dann sein Maximum, wenn das fluoreszierende Teilchen die im Mikroskop scharf eingestellte Düsenöffnung passiert. Das Impulsmaximum hängt dabei wegen der gleichmäßigen Ausleuchtung der Düsenöffnung nicht von der Stelle ab, an der das Teilchen die engste Stelle der Durchflußkammer - nämlich die Düsenöffnung - durchquert. Jedes registrierte Teilchen befindet sich kurzfristig und zwar während der maximalen Lichtemission von Fluoreszenzlicht gerade in der Objektebene des Mikroskopes. Das neue Verfahren ermöglicht eine einwandfreie Messung optischer Eigenschaften von Teilchen beim Durchfluß, was durch eine einfache, quer zur Beobachtungsrichtung des Mikroskopes angeordnete Kapillarröhre nie zu erreichen wäre.

Ein wesentlicher Vorteil der vorgeschlagenen Anordnung besteht weiterhin darin, daß mit Düsenöffnungen gearbeitet werden kann, die wegen ihres großen Durchmessers nicht allzu leicht verstopfen. Durch die Größe des Gesichtsfeldes des Mikroskopes ist eine obere Grenze der Düsenöffnung festgelegt, die auch für Messungen von Teilchen mit sehr viel kleinerem Querschnitt noch ohne weiteres benutzt werden kann. Bei

der impulskonduktometrischen Methode zur Bestimmung der Teilchenzahl und Teilchengröße ist es hingegen erforderlich, für verschieden große Teilchen auch verschieden große Kapillaren zu benutzen. Insbesondere bei der Zählung und Messung sehr kleiner Teilchen ergeben sich wegen allzu häufiger Verlegung der Kapillare oftmals unüberwindliche Schwierigkeiten.

Gleichzeitige Messung mehrerer im selben Teilchen vorhandener fluoreszierender Substanzen mit zwei oder mehreren Photomultipliern in Verbindung mit mehrparametrischen Impulshöhenanalysatoren ermöglicht Aufschlüsse auch über die Mengenverhältnisse von zwei oder mehreren im selben Teilchen enthaltenen Substanzen. Handelt es sich z.B. bei dem "Teilchen" um in Wasser suspendiertes biologisches Material, nämlich um kernhaltige Einzelzellen, deren Zellkerne und deren Zytoplasma vor der Messung mit verschiedenen fluorochromierenden Farbstoffen möglichst selektiv angefärbt worden sind, dann bietet die nunmehr mögliche gleichzeitige Messung des von jeder einzelnen Zelle ausgestrahlten Fluoreszenzmischlichtes mit Hilfe von zwei Photomultipliern, von denen jeder nur auf Fluoreszenzlicht eines der beiden Fluorochrome anspricht, Aufschlüsse über die Mengenverhältnisse der den Zellkern und der das Zytoplasma aufbauenden fluorochromierbaren Substanzen und zwar an jeder individuellen Zelle eines fast beliebig großen Zellkollektivs. Die Impulskonduktometrische Methode dagegen erlaubt solche differenziertere Aussagen nicht. Das neue Meß- und Zählgerät ist Zytrophotometern - z.B. dem Universal-Mikro-Spektralphotometer UMSP I in der Meßgeschwindigkeit weit überlegen.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen mit ihrem Dispersionsmedium mit großer Geschwindigkeit eine im Mikroskop scharf eingestellte Düsenöffnung passieren, wobei Änderungen des Lichtstromes im Sinne einer Abschwächung oder Verstärkung eintreten, die über Mikroskop, Photomultiplier und Verstärker- und Zähleinrichtungen nach Art, Form und Größe registriert werden.
2. Automatisches Meß- und Zählgerät nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung der Anzahl von Teilchen in vorgegebenen Volumina des Dispersionsmediums bei Dunkel-  
feldbeleuchtung das von jedem Teilchen ausgehende und in das Mikroskopobjektiv gelangende Streulicht als Zählsignal verwendet wird.
3. Automatisches Meß- und Zählgerät nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß der von jedem Teilchen bei seinem Durchtritt durch die Düsenöffnung ausgehende maximale Fluoreszenzlichtimpuls über optische Teilerscheiben gleichzeitig auf mehrere Photomultiplier geleitet wird, die sich voneinander dadurch unterscheiden, daß jeder Photomultiplier für andere Wellenlängenbereiche des Fluoreszenzlichtes besonders lichtempfindlich ist, und daß die Registrierung der zeitlich zusammenfallenden elektrischen Impulse verschiedener Photomultiplier mit Hilfe eines mehrparametrischen Impulshöhenanalysators erfolgt.

**14**  
Leerseite

1815352

FIG. 1

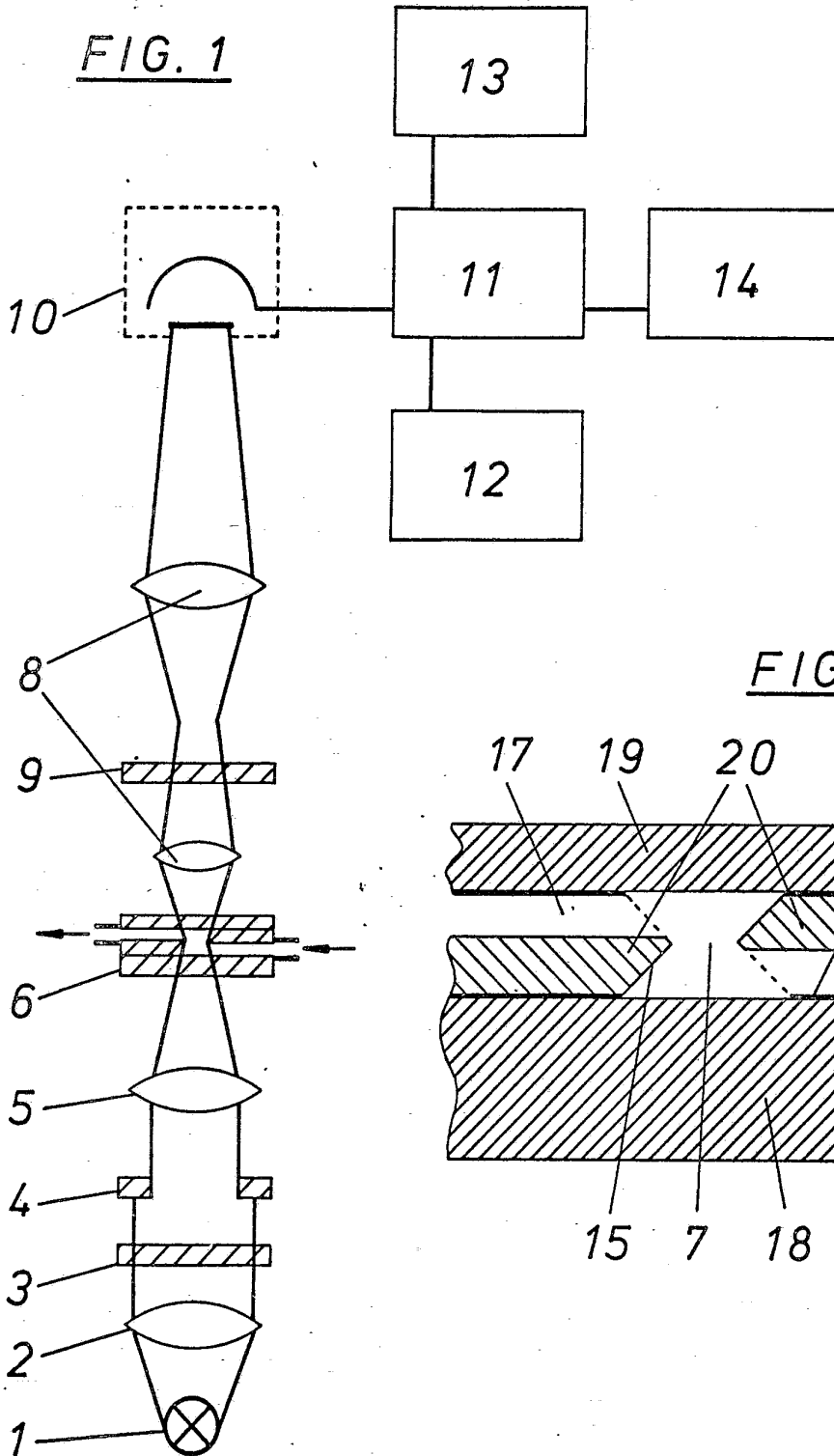


FIG. 2

