

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 343**

51 Int. Cl.:

G01N 33/44 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014 PCT/FI2014/050725**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014 E 14790116 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3071969**

54 Título: **Método de análisis**

30 Prioridad:

19.11.2013 FI 20130343

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.06.2018

73 Titular/es:

**KEMIRA OYJ (100.0%)
Porkkalankatu 3
00180 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

HÄRMÄ, HARRI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 343 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de análisis

Campo

5 Esta invención se refiere a un método para medir la concentración de uno o más polímeros orgánicos en una muestra con la ayuda de iones de lantánido(III).

Antecedentes

10 Debido a sus propiedades de luminiscencia únicas, los quelatos de lantánido(III) a menudo se utilizan como marcadores no radiactivos en una amplia variedad de aplicaciones rutinarias y de investigación. Por ejemplo, el documento de patente US 4.565.670 describe un método heterogéneo para la determinación espectroscópica de fluorescencia de una sustancia biológicamente activa en la que un ion lantánido se disocia del reactante inmune marcado con EDTA a un valor bajo de pH en una disolución que contiene un detergente adecuado, un compuesto sinérgico y una β -dicetona para amplificar la fluorescencia después de la separación.

15 Los quelatos de lantánido(III) luminiscentes estables han extendido el uso de la resolución temporal a ensayos homogéneos. Por ejemplo, el documento de patente EP 0324 323A describe un ensayo inmunoquímico que incluye un quelato de lantánido(III) luminiscente unido covalentemente a un reactante inmune y a una o más sustancias moduladoras de la fluorescencia tales como proteínas y detergentes.

20 En los ensayos descritos anteriormente, la detección se basa en el análisis fluorométrico resuelto en el tiempo de la señal derivada de un quelato de lantánido(III) que incluye una o más estructuras aromáticas, que absorben la energía de excitación y la transfieren al ion de lantánido(III), y grupos quelatantes tales como β -dicetonas y ácidos carboxílicos. También se sabe que los residuos de tirosina y fosfotirosina de péptidos y proteínas sensibilizan la luminiscencia del terbio. Estos métodos se refieren al uso de una concentración conocida de residuos peptídicos añadidos a la muestra a una concentración conocida. Se hace un seguimiento del cambio en la modificación del péptido y a la concentración conocida de la enzima y sus inhibidores y potenciadores de actividad/unión. En otras palabras, todas las concentraciones de todas las moléculas en la reacción son conocidas.

25 El documento de patente US 2011/0111388 describe un método de detección de un analito que contiene poliaminoácidos y otras macromoléculas en la ayuda de marcadores luminiscentes que están acoplados al analito después de la activación química.

El documento de patente US 6.329.205 describe la tinción de polímeros que contienen aminas usando complejos fotoluminiscentes de europio(III).

30 Las estructuras aromáticas que presentan las propiedades descritas anteriormente también son conocidas en la técnica como antenas.

35 Se sabe que los iones de lantánido(III) se pueden detectar también en ausencia de moléculas antena. Bekiari *et al.*, han demostrado que la asociación de iones lantánidos con los oxígenos del éter de los grupos etilenglicol de las cadenas de PEG da como resultado el aumento de su intensidad de luminiscencia en varios entornos fluidos (*Chem. Mater* 1999, 11, 3189-3195). El documento enseña que dicha dependencia de concentración se logra para PEG-200 y PEG-400 no iónico de bajo peso molecular cuando se mide en presencia de una concentración relativamente alta de ion lantánido (40 mM) y usando un método de detección de luminiscencia resuelta en el tiempo. La concentración más baja detectable fue una disolución aproximadamente al 10% (en peso) de PEG-200 correspondiente a una disolución de concentración 0,5 M.

40 El documento de patente WO 2011088193 presenta un método para detectar una diana, que puede comprender, por ejemplo, polímeros, a través del suministro a un sujeto de una composición de sonda luminiscente que puede comprender un ion de lantánido(III), y detectar una señal producida desde la composición de sonda luminiscente.

Compendio

45 La presente invención se basa en la observación de que el examen de los polímeros orgánicos que incluyen dos o más grupos quelantes se puede realizar simplemente al mezclarlos con ion de lantánido(III) en forma de sal de lantánido y detectar la señal del ion de lantánido(III) quelado con los polímeros orgánicos.

La presente divulgación se refiere a un método para medir la concentración de uno o más polímeros orgánicos en una muestra, incluyendo el método:

50 - mezclar la muestra y el ion de lantánido(III) , en donde la concentración total de las moléculas orgánicas en la muestra es inferior a 0,5 M y la concentración del ion de lantánido(III) es ≤ 10 mM, a modo de ejemplo entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 0,001 mM,

- detectar la señal derivada del ion de lantánido(III) con medición del tiempo de vida de la luminiscencia, y

- medir la cantidad de uno o más polímeros orgánicos en la muestra en función de la señal derivada del ion de lantánido(III), en donde el polímero orgánico incluye dos o más grupos que pueden quelarse con el ion de lantánido(III) y se seleccionan de carboxilatos, sulfonatos, carboxamidas, fosfatos, fosfonatos y aminas, con la condición de que el polímero no sea proteína u oligopéptido.

- 5 De acuerdo con un aspecto, la tecnología de la presente invención se refiere a un método para medir la concentración de uno o más polímeros orgánicos en una muestra cómo se define en la reivindicación 1.

De acuerdo con otro aspecto, la tecnología de la presente invención se refiere a un producto de programa informático que incluye instrucciones ejecutables por ordenador para controlar un procesador programable con el fin de examinar una muestra en donde el programa está adaptado para evaluar los datos obtenibles mediante un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

10

De acuerdo con otro aspecto, la tecnología de la presente invención se refiere a un producto de programa informático que comprende un medio legible por ordenador codificado con un programa informático de acuerdo con la reivindicación 14.

Se describen aspectos adicionales de la tecnología de la presente invención en las reivindicaciones anexas.

- 15 Los verbos "comprender" e "incluir" se utilizan en este documento como limitaciones abiertas que no excluyen ni requieren la existencia de características no citadas. Las características citadas en las reivindicaciones anexas se pueden combinar entre sí libremente, a menos que se establezca explícitamente lo contrario. Además, debe entenderse que el uso de "un" o "una", es decir, una forma singular, a lo largo de este documento no excluye una pluralidad.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un esquema ilustrativo del principio de la tecnología de la presente invención. Un ion lantánido (A) en solitario, proporciona un nivel bajo o nulo de señal de luminiscencia (izquierda). Al mezclar el ion lantánido con un polímero orgánico (B) que contiene grupos quelantes (C) tales como carboxilatos, sulfonatos, fosfatos, fosfonatos y/o aminas, se mide la señal de alta luminiscencia (derecha). La señal se correlaciona con la concentración de la muestra.

25

La Figura 2 ilustra la medición de círculo: sulfonato de poliestireno; triángulo: PEG 400; cuadrado: PEG 6000; y estrella: polietilenimina. La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a la longitud de onda de excitación de 340 nm y a la longitud de onda de emisión de 615 y 1 mM de EuCl_3 en H_2O . Eje X: concentración de diferentes compuestos (% en peso); Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

30 La Figura 3 ilustra la medición de PEG 400 en presencia de tres concentraciones de Eu^{3+} diferentes. La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a la longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Círculo: EuCl_3 10 mM; Cuadrado gris: EuCl_3 1 mM; y Triángulo: EuCl_3 0,10 mM. Eje X: concentración de PEG 400 (mM); Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

35 La Figura 4 ilustra la medición de PEG 6000 en presencia de tres concentraciones de Eu^{3+} diferentes. La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a la longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Círculo: EuCl_3 10 mM; Cuadrado gris: EuCl_3 1 mM; y Triángulo: EuCl_3 0,10 mM. Eje X: concentración de PEG 6000 (mM); Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

40 La Figura 5 ilustra la medición de un copolímero sulfonado en presencia de EuCl_3 (0,0001 mM) y HEPES (5 mM). La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a una longitud de onda de excitación de 240 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Eje X: concentración (ppm); Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

45 La Figura 6 ilustra la medición de otro copolímero sulfonado en presencia de EuCl_3 (0,0001 mM) y HEPES (5 mM). La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a una longitud de onda de excitación de 395 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Eje X: concentración (ppm). Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

La Figura 7 ilustra la medición de un copolímero sulfonado (cuadrado) y un copolímero sulfonado con un resto de fósforo (círculo) en presencia de EuCl_3 (0,01 mM) y HEPES (5 mM). La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a una longitud de onda de excitación de 395 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Eje X: concentración (ppm); Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

50 La Figura 8 ilustra la medición de un copolímero sulfonado (punteado) y un copolímero sulfonado con un resto fluorescente (gris) y la determinación de la concentración total de dos polímeros en diversas relaciones. Las relaciones utilizadas se dan como marcadas:no marcadas: 1:1 (líneas diagonales); 9:1 (zigzag) y 1:9 (cuadrícula). Las mediciones se realizaron en presencia de EuCl_3 (0,01 mM) y HEPES (5 mM). La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a una longitud de onda de excitación de 395 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Eje

X: concentración total de polímero en la muestra (ppm); Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

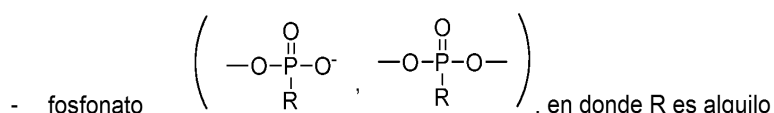
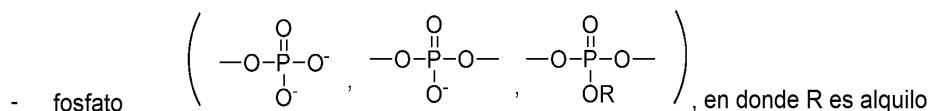
5 La Figura 9 ilustra la medición de un ácido poliacrílico (cuadrado) y un ácido polimaleico (círculo) en presencia de EuCl_3 (0,01 mM) y HEPES (5 mM). La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a una longitud de onda de excitación de 240 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Eje X: concentración (ppm); Eje Y: señal de luminiscencia resuelta en el tiempo (recuentos).

La Figura 10 ilustra la medición de un copolímero sulfonado (líneas diagonales) y un copolímero sulfonado con resto fluorescente (negro) y la medición de estos dos polímeros en una mezcla (gris) en agua producida en el Mar del Norte. Eje Y: recuentos de fotones, Eje X: concentración total de polímero en la muestra.

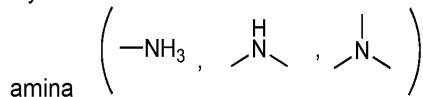
10 Descripción

El polímero orgánico medido de acuerdo con la tecnología de la presente invención incluye dos o más grupos quelantes seleccionados de carboxilatos, sulfonatos, fosfatos, fosfonatos y aminas. En consecuencia, los grupos quelantes son los siguientes:

- carboxilato (COO^-),
- sulfonato ($-\text{SO}_3^-$)
- carboxamida ($-\text{CONH}-, -\text{NHCO}-, -\text{CONH}_2$)



y



15 Estos grupos tienen la capacidad de quelarse con un ion de lantánido(III). La carga neta del polímero orgánico puede cambiar en función del pH, y puede ser negativa, positiva y neutral. El polímero orgánico también puede ser zwitteriónico.

Como se define en la presente memoria, la expresión grupo quelante incluye grupos ionizantes. De acuerdo con una realización preferida, los grupos quelantes están negativamente cargados.

20 Como se define en la presente memoria, un quelato de lantánido es un compuesto químico en forma de un anillo heterocíclico que contiene un ion lantánido unido por enlaces coordinados a al menos dos iones no metálicos.

25 Como se define en la presente memoria, el polímero orgánico incluye dos o más grupos ionizables/quelantes, preferiblemente al menos tres grupos ionizables/quelantes, más preferiblemente más de cuatro grupos ionizables/quelantes y más preferiblemente más de 12 grupos ionizables/quelantes que tienen la capacidad de quelarse con el ion de lantánido(III), es decir, para formar un quelato de lantánido. Los grupos se seleccionan de carboxilatos, sulfonatos, fosfatos, carboxamidas y aminas. De acuerdo con una realización preferible, los grupos se seleccionan de carboxilatos, sulfonatos, fosfatos, y aminas.

Como se define en la presente memoria, un polímero es un compuesto químico o mezcla de compuestos que consiste en unidades estructurales repetitivas creadas a través de un procedimiento de polimerización.

30 El polímero orgánico que se detectará de acuerdo con la tecnología de la presente invención no necesita contener grupos aromáticos que puedan quelarse con el ion lantánido y absorber la energía de excitación y transferirla esencialmente al ion de lantánido(III), es decir, actuar como un grupo antena. El grupo antena debe tener suficientes propiedades de transferencia de energía y debe estar cerca del ion de lantánido(III) quelado. Los grupos antena ilustrativos se han descrito en *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20 (3), pp 404-421. De acuerdo con una realización, el polímero orgánico a analizar de acuerdo con la tecnología de la presente invención no incluye un grupo aromático

35 en el que hay menos de tres enlaces entre el grupo aromático y al menos uno de los dos o más grupos quelantes/ionizables.

De acuerdo con una realización, el polímero orgánico medido de acuerdo con la tecnología de la presente invención no incluye ningún grupo aromático.

5 Como se define en la presente memoria, la concentración del polímero orgánico en la muestra es desconocida. En la técnica anterior existen métodos en los que se conoce la concentración de moléculas en una reacción, pero la molécula de muestra puede tomar dos o más formas, por ejemplo, por fosforilación/desfosforilación en la actividad de la enzima.

El ion lantánido usado en la tecnología de la presente invención se selecciona entre europio, terbio, samario y disprosio, preferiblemente entre europio y terbio, siendo incluso más preferiblemente europio. Se puede usar una combinación de iones lantánidos de acuerdo con la invención.

10 El ion lantánido usado en la presente invención está en forma de sal de lantánido, tal como cloruro de lantánido(III) o acetato de lantánido(III). Una sal de lantánido(III) preferible es el haluro de lantánido(III), tal como cloruro de europio(III). Por consiguiente, el ion de lantánido(III) se introduce como una sal, tal como cloruro de europio y se forma el quelato de lantánido(III) tras la conjugación del ion de lantánido(III) con la muestra.

15 La molécula orgánica es polimérica. De acuerdo con una realización, su peso molecular es superior a 400 g/mol. Las moléculas quelantes poliméricas ilustrativas son ADN, sulfonatos de poliestireno y polietileniminas. Cuando se carga, el polímero orgánico puede ser aniónico, catiónico y zwitteriónico.

20 La Figura 1 ilustra el principio del método de la tecnología de la presente invención. La señal resuelta en el tiempo derivada del ion de lantánido(III), tal como Eu^{3+} aumenta en presencia de moléculas cargadas tales como polímeros orgánicos cargados. Esta observación se ha utilizado en la medición de la presencia y/o cantidad de uno o más polímeros orgánicos en la muestra.

25 La Figura 2 ilustra un ejemplo de realización de la tecnología de la presente invención. Se midieron diferentes compuestos en presencia de 1 mM de Eu^{3+} . Todos los datos se monitorizaron a una longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm, y se detectó la señal de europio en función de la concentración de la molécula orgánica. Se ve claramente que la señal de europio depende de la concentración de los polímeros orgánicos aniónicos (cuadrado gris; sulfonato de poliestireno), y catiónicos (estrella; polietilenimina). En estricto contraste, la señal de europio no cambia en función de las moléculas orgánicas no cargadas.

30 Las figuras 3 y 4 ilustran ejemplos comparativos en los que se midieron dos polímeros orgánicos no cargados (PEG 400 y PEG 6000) en presencia de tres concentraciones diferentes de Eu^{3+} . Todos los datos se monitorizaron a una longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm. Se ve claramente que en ambos casos la señal de europio no cambia en función de la concentración de Eu^{3+} .

35 La tecnología de la presente invención tiene varias ventajas. La detección de una baja concentración de la muestra es a menudo preferida. La técnica anterior enseña que se puede detectar una disolución al 10% en peso (correspondiente a una disolución de concentración 0,5 M) de polietilenglicol no iónico, pero usando una cantidad significativa de iones lantánidos. Como se describe en este documento, se puede lograr una reducción significativa del límite de detección y la concentración de iones lantánidos cuando la sustancia de muestra es iónica. Como se muestra en la presente memoria incluso utilizando una disolución 10 mM de ión lantánido, no se puede detectar ninguna señal de luminiscencia dependiente de polietilenglicol incluso a un nivel de concentración de 0,5 M para polietilenglicol 400 o 6000. Por el contrario, los polímeros orgánicos cargados tales como sulfonato de poliestireno y polietilenimina emiten una señal de europio dependiente del sustrato en un amplio intervalo de concentraciones incluso en presencia de pequeñas cantidades de ión de lantánido(III), es decir, 1 mM-0,01 mM (figuras 7-10), e incluso tan bajas como de 0,0001 mM (figuras 5 y 6)

45 Se sabe que a una alta concentración de la sustancia de muestra polimérica y el ion lantánido éstos se precipitan fácilmente. Por lo tanto, la concentración de la sustancia de muestra y el ion lantánido debe ser lo suficientemente baja para lograr una disolución suficientemente transparente a la vista para la medición. De acuerdo con el método descrito en la presente memoria, la concentración de ion lantánido debe estar por debajo de aproximadamente 10 mM, preferiblemente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 0,0001 mM, o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 0,001 mM, más preferiblemente entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 0,01 mM, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 mM y 0,01 mM y lo más preferible de aproximadamente 0,01 mM. La concentración del polímero orgánico en la muestra debe ser inferior al 10% en peso. Si la concentración inicial de polímero orgánico en la muestra es superior al 10% en peso, debe diluirse la muestra. El diluyente ilustrativo es agua o una disolución tampón acuosa.

55 El método de la invención no es específico. La no especificidad debe entenderse como que no se usan aglutinantes específicos tales como anticuerpos de alta afinidad ($> 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) y que la interacción del ion lantánido con la muestra no tiene un sitio de unión predeterminado. Otros iones tal como los cationes se pueden unir a la muestra ya que la muestra no tiene una propiedad de unión predeterminada con el ion lantánido.

El análisis de la molécula orgánica de acuerdo con el método de la tecnología de la presente invención se realiza en un recipiente de detección. El recipiente puede ser, por ejemplo, un pocillo, una parte de un dispositivo fluídico o una cubeta.

5 En algunas aplicaciones, la muestra incluye moléculas que se deben eliminar o diluir antes del análisis. De acuerdo con esta realización, la muestra se somete a una etapa de pretratamiento antes de la mezcla con el ion de lantánido(III). Los ejemplos de métodos de pretratamiento son cromatografía de exclusión por tamaño, filtración y dilución con una disolución apropiada. Se debe de entender que la etapa de pretratamiento significa preferiblemente la eliminación o dilución de moléculas que pueden alterar el examen de las moléculas cargadas de interés, no el aislamiento del polímero orgánico cargado, por ejemplo, por cromatografía.

10 El método descrito anteriormente se puede usar para medir la cantidad de polímeros orgánicos en la muestra. Si se conoce la sustancia de muestra, el método permite la cuantificación del polímero orgánico cargado en la muestra. También permite la cuantificación de la cantidad total de polímeros orgánicos cargados en la muestra.

15 El análisis de la molécula orgánica de acuerdo con el método de la tecnología de la presente invención puede ser cuantitativo. Para el análisis cuantitativo, normalmente se prepara primero una curva patrón o punto patrón y luego se calcula la concentración de la sustancia de muestra conocida utilizando la curva patrón o el punto patrón. De forma alternativa, el instrumento ha sido precalibrado para soportar la cuantificación.

20 De acuerdo con una realización de la tecnología de la presente invención, el ión de lantánido(III) se detecta utilizando dos o más longitudes de onda de luminiscencia en función del tiempo de medición. Las dos o más longitudes de onda se refieren a dos o más longitudes de onda de excitación o a dos o más longitudes de onda de emisión. En un ejemplo, el ion de lantánido(III) se detecta usando dos longitudes de onda de excitación y una longitud de onda de emisión. En otro ejemplo, se usan dos longitudes de onda de excitación y dos longitudes de onda de emisión para detectar el ion de lantánido(III). Preferiblemente, se usan dos o más longitudes de onda de excitación y una longitud de onda de emisión. La presente divulgación se refiere además a un programa informático que incluye módulos de software para determinar información indicativa para la muestra, con el fin de evaluar la
25 señal derivada del método. Los módulos de software pueden ser, por ejemplo, subrutinas de funciones implementadas con un lenguaje de programación adecuado y con un compilador adecuado para el lenguaje de programación y el procesador programable.

30 Un producto de programa informático de acuerdo con una realización ilustrativa de la tecnología de la presente invención incluye un medio legible por ordenador, por ejemplo, un disco compacto, codificado con un programa informático de acuerdo con una realización de la tecnología de la presente invención, como se define a través de las reivindicaciones. Una señal de acuerdo con la realización ilustrativa está codificada para transportar información que define un programa informático de acuerdo con la realización.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medición de polímeros con Eu^{3+} . Un procedimiento ilustrativo

35 Los ensayos descritos en las figuras 5 y 6 se realizaron preparando una disolución tampón de ensayo añadiendo 100 μl de 500 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 y 10 μl de 10 μM EuCl_3 a 800 μl de agua desionizada. Se colocaron 25 μl de tampón de ensayo en pocillos de placas de microtitulación negras y se añadieron 225 μl de muestra en salmuera en la parte superior. La señal de luminiscencia de Eu^{3+} se monitorizó a una longitud de onda de excitación de 240 nm y 395 (experimentos descritos en las figuras 5 y 6, respectivamente) y a una longitud de onda de emisión de 615 nm con un espectrofluorómetro TECAN M1000 (Tecan, Männedorf, Austria).
40

Ejemplo 2: Medición de polímeros múltiples y determinación de la concentración total de polímeros

45 La concentración total de polímeros mezclados en diversas relaciones se determinó añadiendo 2,5 ml de muestra en salmuera (NaCl 35,03 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,24 g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,46 g/l, KCl 0,21 g/l y $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a una cubeta de PS que contenía 25 μl de 500 mM HEPES-NaOH pH 7,4 y 25 μl de 1 mM EuCl_3 . Después de mezclar, se monitorizó la señal de luminiscencia de Eu^{3+} a una longitud de onda de excitación de 395 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm con un espectrofluorómetro (Aqsens, Espoo, Finlandia). Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 3: Medición de la concentración de polímeros en las muestras de agua producida

50 Se prepararon dos conjuntos de muestras patrón que contenían patrones de 0, 10, 20, 50 y 100 ppm añadiendo la disolución de sal (NaCl 35,03 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,24 g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,46 g/l, KCl 0,21 g/l y $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) con polímero. El primer conjunto de patrones contenía polímero sin marcar. El segundo conjunto de patrones contenía polímero con resto fluorescente. Las muestras que contenían los dos polímeros en la mezcla se prepararon añadiendo agua producida obtenida de un campo de petróleo en el Mar del Norte.

Concentración de polímeros en las muestras de agua producidas:

Matriz	Concentración resto fluorescente (ppm)	Concentración sin marcar (ppm)	Concentración total (ppm)
Agua producida	0	0	0
Agua producida	1	9	10
Agua producida	1	19	20
Agua producida	30	20	50
Agua producida	80	20	100

Las muestras y los patrones se pretrataron con columnas de gelfiltración (Illustra NAP-25, GE life-science, EE.UU.). Las columnas se equilibraron con 20 ml de la disolución de sal antes de agregar la muestra. Se colocó un tubo de recogida de muestras debajo de las columnas y se añadieron 2,5 ml de muestra a la columna seguido de 3 ml de salmuera para eluir el polímero de la columna. Se recogió un total de 5,5 ml de muestra.

- 5 La medición se llevó a cabo añadiendo 2,5 ml de muestra pretratada o patrón a una cubeta de PS que contenía 25 μ l de 500 mM HEPES-NaOH pH 7,4 y 25 μ l de 1 mM EuCl_3 . Después de mezclar, se monitorizó la señal de luminiscencia de Eu^{3+} a una longitud de onda de excitación de 395 nm y a una longitud de onda de emisión de 615 nm con un espectrofluorómetro (Aqsens, Espoo, Finlandia). Los resultados se muestran en la Figura 10.

Ejemplo 4: Análisis de copolímero sulfonado y copolímero sulfonado con un resto de fósforo

- 10 El ensayo se realizó preparando una disolución tampón de ensayo añadiendo 100 μ l de 500 mM HEPES-NaOH pH 7,4 y 10 μ l de 100 μ M EuCl_3 a 800 μ l de agua desionizada. Se pusieron 25 μ l de tampón de ensayo en el fondo de placas de microtitulación negras y se añadieron 225 μ l de muestra en salmuera en la parte superior.

Ejemplo 5: Medición de la concentración de ácido poliacrílico y ácido polimaleico

- 15 El ensayo se realizó preparando una disolución tampón de ensayo añadiendo 100 μ l de 500 mM HEPES-NaOH pH 7,4 y 10 μ l de 100 μ M EuCl_3 a 800 μ l de agua desionizada. Se pusieron 25 μ l de tampón de ensayo en el fondo de placas de microtitulación negras y se añadieron 225 μ l de muestra en salmuera en la parte superior.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la concentración de uno o más polímeros orgánicos en una muestra, comprendiendo el método:
- 5 - mezclar la muestra y el ion de lantánido(III) en forma de sal de lantánido, en donde la concentración total de los polímeros orgánicos en la muestra es inferior a 0,5 M y la concentración del ion de lantánido(III) es ≤ 10 mM,
- detectar la señal derivada del ion de lantánido(III) con medición del tiempo de vida de la luminiscencia, y
- medir la cantidad de uno o más polímeros orgánicos en la muestra en función de la señal derivada del ion de lantánido(III), en donde el polímero orgánico comprende dos o más grupos que pueden quelarse con el ion de lantánido(III) y se seleccionan de carboxilatos, sulfonatos, carboxamidas, fosfatos, fosfonatos y aminas, con la condición de que el polímero no sea proteína u oligopéptido.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración del ion de lantánido(III) es de 0,001 mM a 10 mM.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el ion de lantánido(III) se mezcla como haluro de lantánido (III).
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el haluro de lantánido(III) se selecciona de cloruro de europio (III) y cloruro de terbio (III).
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el haluro de lantánido(III) es cloruro de europio(III).
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que al menos uno de los polímeros orgánicos no comprende un grupo aromático que sea capaz de absorber energía de excitación y transferirla esencialmente al ion de lantánido(III).
- 20 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende introducir la muestra a través de un sistema de pretratamiento antes de mezclar con el ion de lantánido(III).
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sistema se selecciona de dilución, filtración y cromatografía de exclusión por tamaño.
- 25 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el uno o más polímeros orgánicos tiene un peso molecular > 400 g/mol.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra comprende dos o más polímeros orgánicos y se cuantifica uno de los polímeros orgánicos.
- 30 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra comprende dos o más polímeros orgánicos y se cuantifican dos o más de los polímeros orgánicos.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra comprende dos o más polímeros orgánicos y se cuantifica la cantidad total de los polímeros orgánicos.
- 35 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el ion de lantánido(III) se detecta usando dos o más longitudes de onda de luminiscencia en función del tiempo de medición.
14. Un producto de programa informático que incluye instrucciones ejecutables por ordenador para controlar un procesador programable con el fin de examinar una muestra, en el que el programa informático está adaptado para realizar un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 40 15. Un producto de programa informático que comprende un medio legible por ordenador codificado con un programa informático de acuerdo con la reivindicación 14.

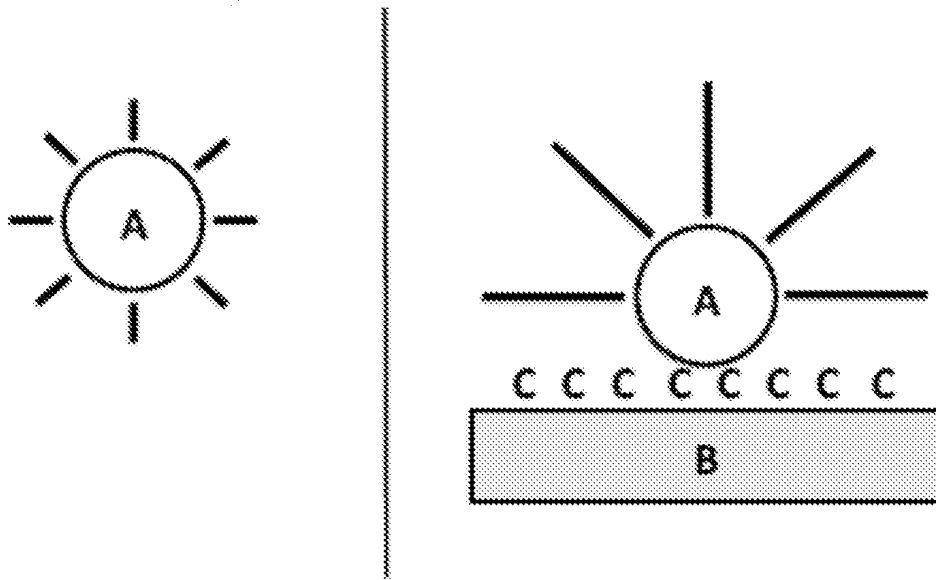


Figura 1

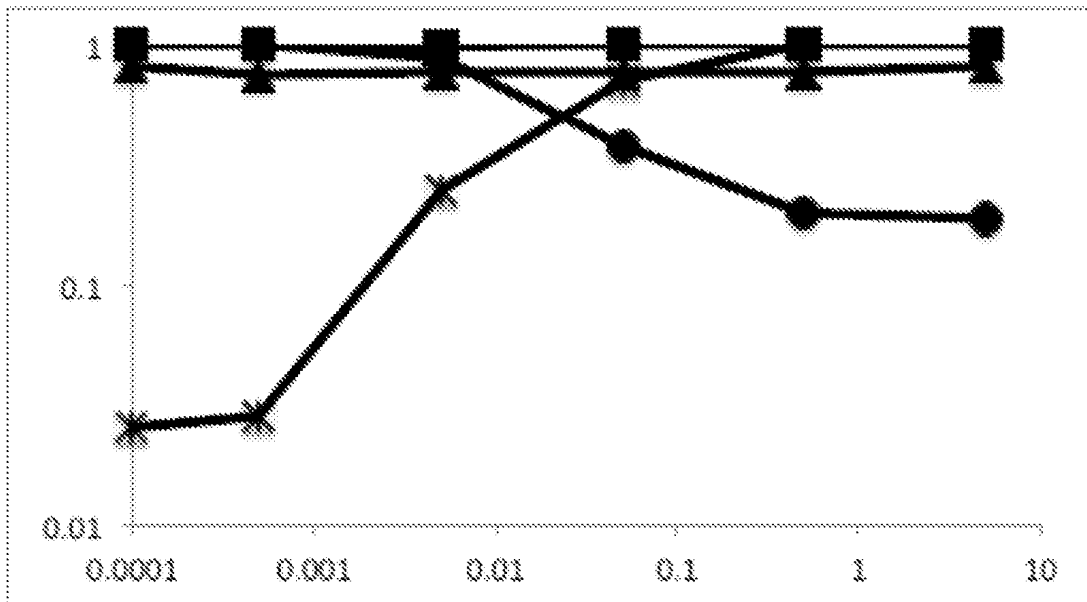


Figura 2

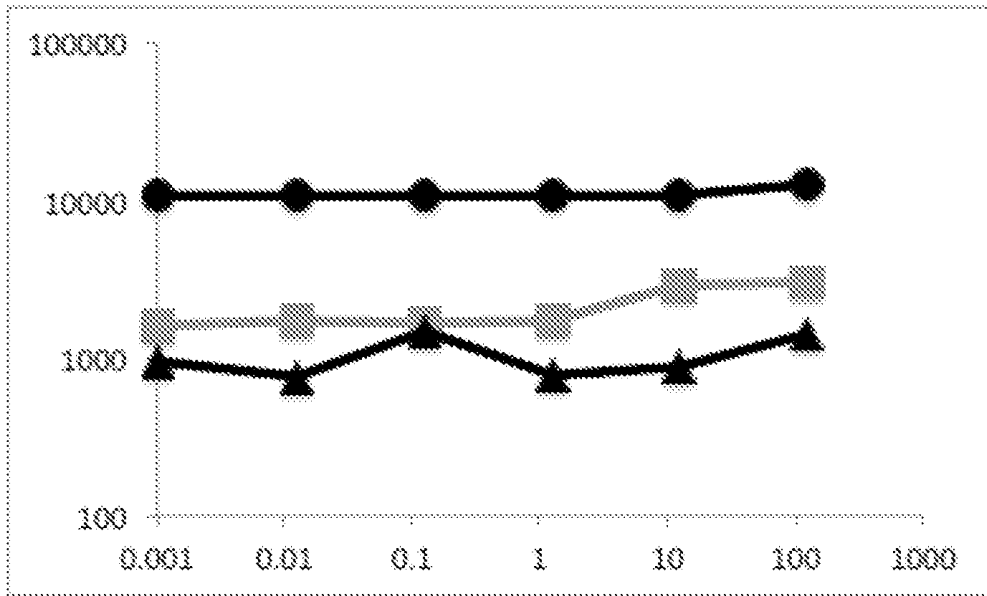


Figura 3

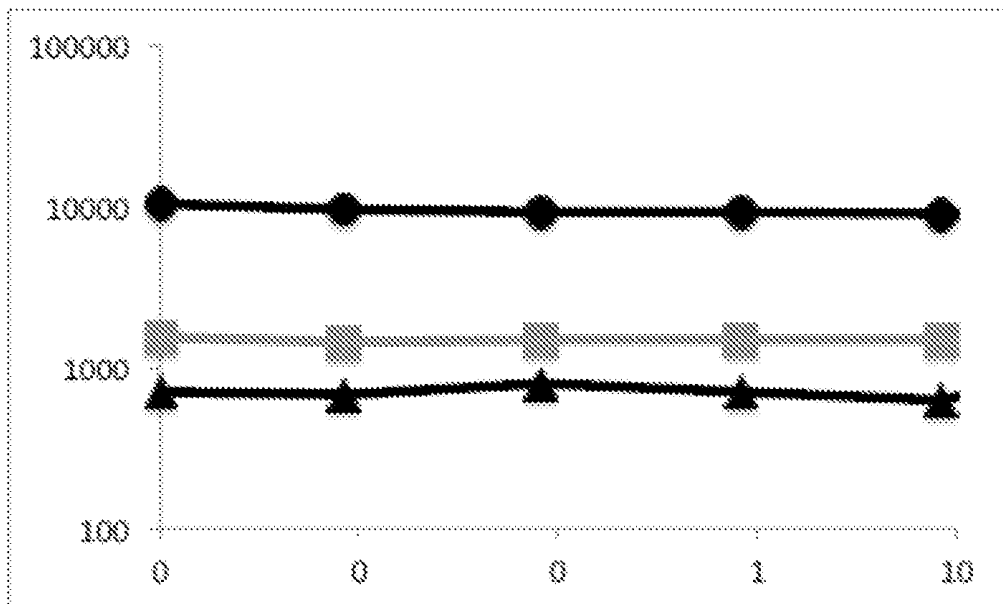


Figura 4

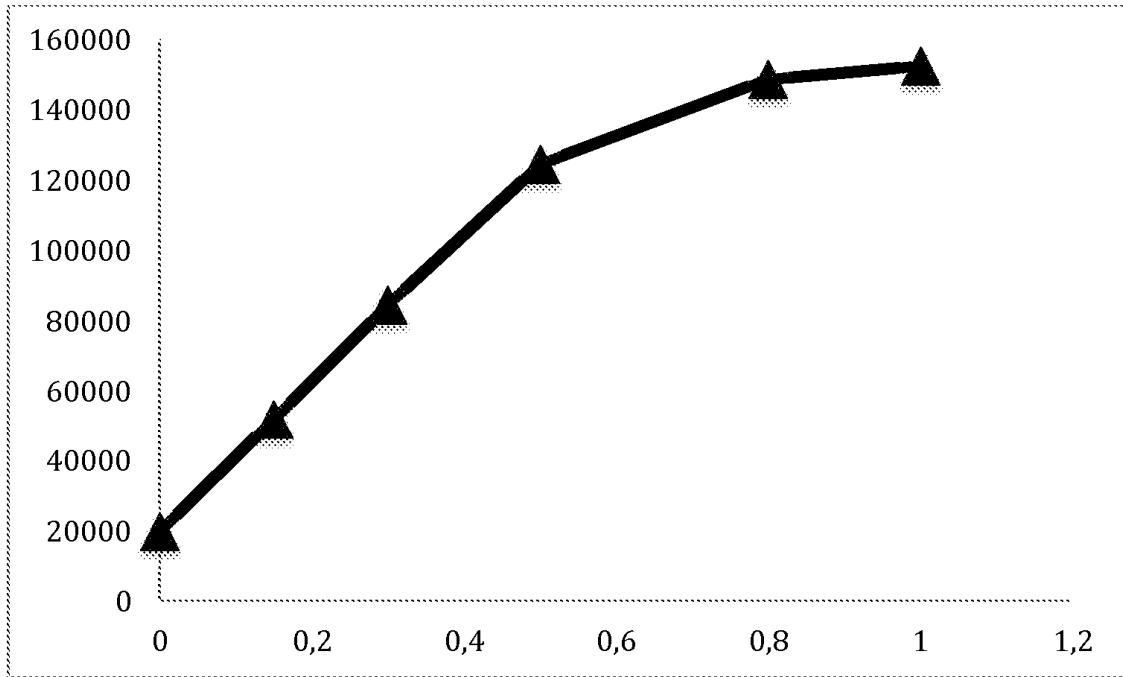


Figura 5

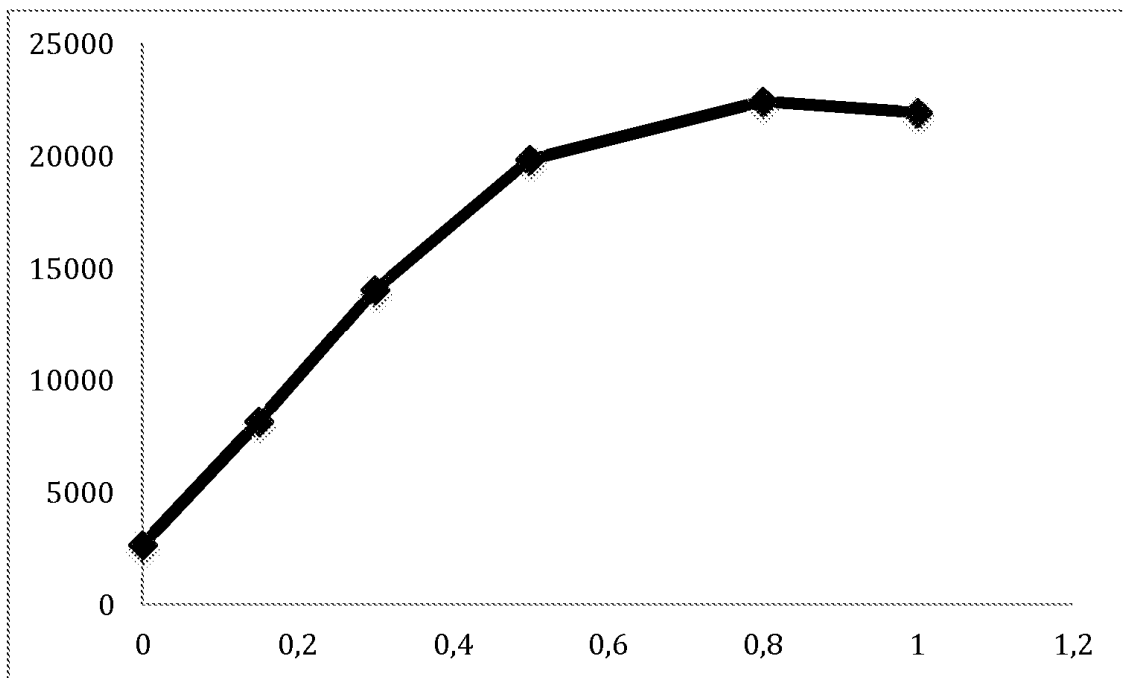


Figura 6

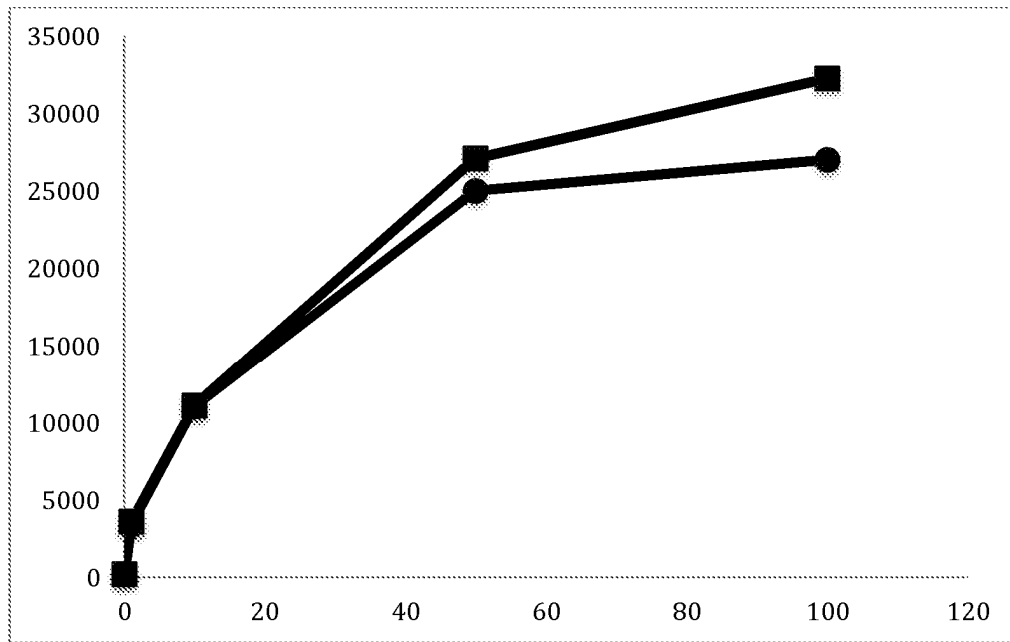


Figura 7

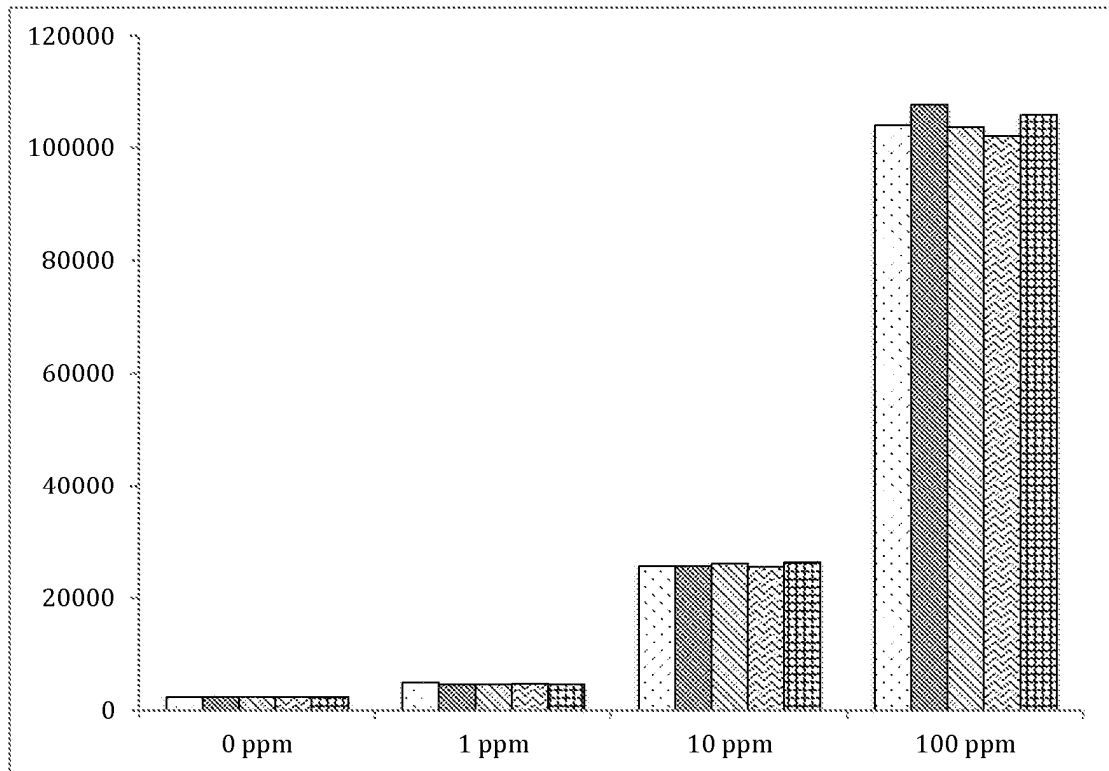


Figura 8

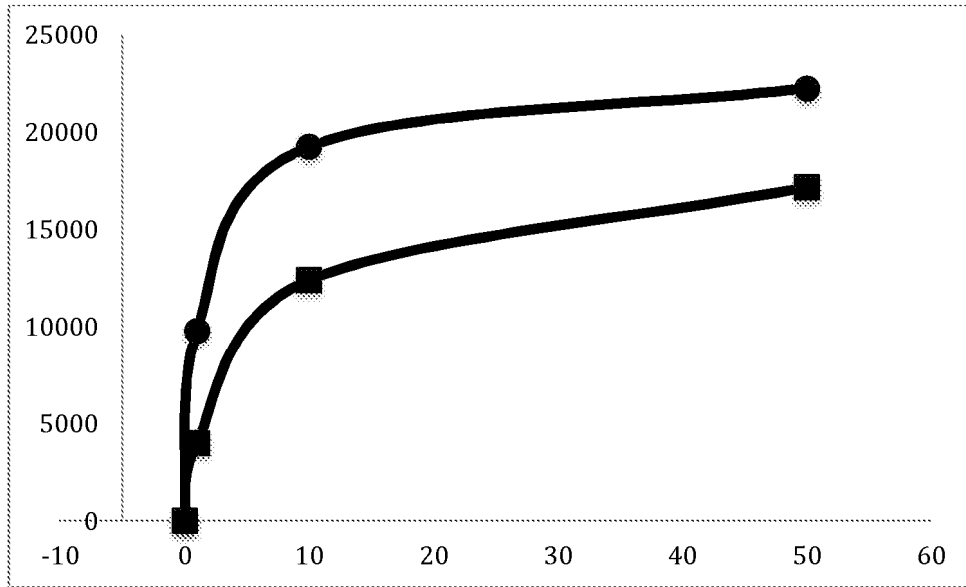


Figura 9

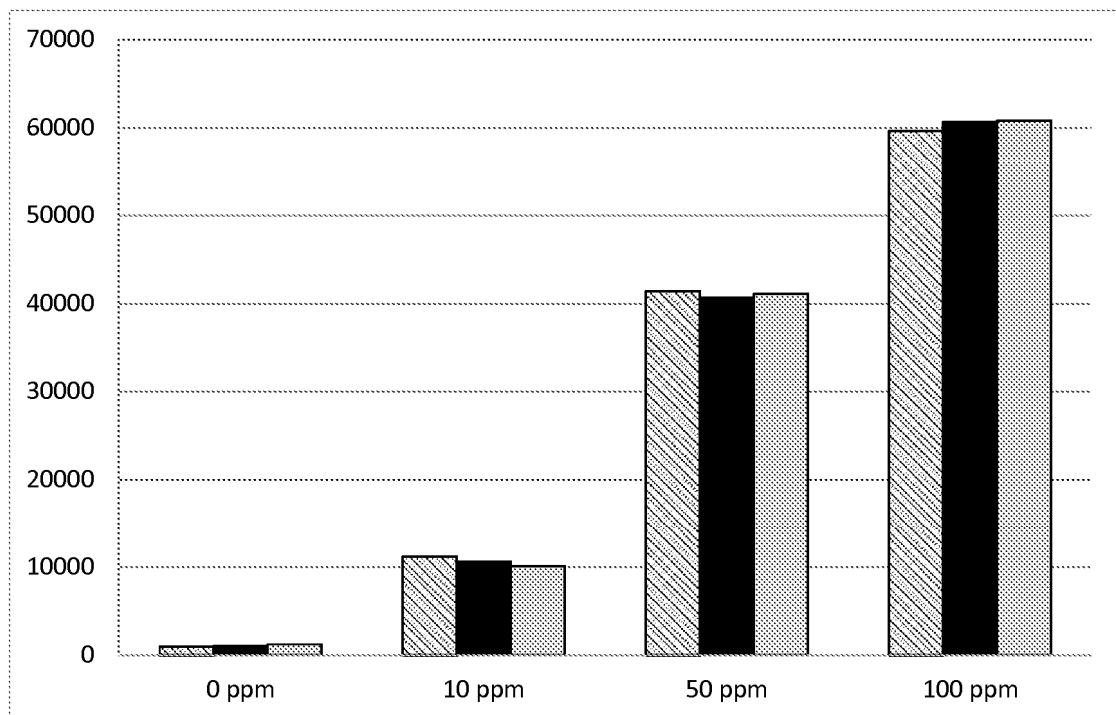


Figura 10